



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*
y evaluación de su potencial como bioinsecticida contra
Spodoptera frugiperla (gusano cogollero del maíz)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MINERVA SILVIA MÁRQUEZ VILLAR

TUTORA:

M. EN C. JUANA MABEL HERNÁNDEZ ALTAMIRANO



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Márquez

Villar

Minerva Silvia

595 95 4 42 68

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

401015766

2. Datos del tutor

M en C

Juana Mabel

Hernández

Altamirano

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Víctor Manuel

Chávez

Ávila

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Robert Arthur

Bye

Boettler

5. Datos del sinodal 3

M en C

Laura Patricia

Lina

García

6. Datos del sinodal 4

M en C

Josefina

Herrera

Santoyo

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* y evaluación de su potencial como bioinsecticida contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz)

98 p

2007

A mis padres:

Silvia y Manuel por todo el amor que me dan, por creer en mí, por su apoyo incondicional, por sus sabios consejos. Mil gracias. Los amo.

A mis hermanos:

Amira, Javier por su amor, apoyo y comprensión, sobre todo por su amistad. Los quiero mucho.

A mi esposo:

Israel Vargas gracias por tu amor, por estar conmigo, por tu apoyo y paciencia. Te amo

Agradecimientos

A mi mamá y mi hermana por su gran paciencia, por ayudarme con el negocio, sin ustedes no hubiera terminado a tiempo.

A mi Alma Mater la UNAM por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de recibir una excelente formación académica.

A mi tutora y sobre todo gran amiga la M. en C. Mabel Hernández Altamirano por todo el apoyo académico y moral que brindo durante la realización de este trabajo, por ser siempre un ejemplo de amistad, trabajo y esfuerzo, por enseñarme que siempre hay que dar lo mejor de uno.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por su ayuda académica y moral durante mi estancia en el mismo, por sus observaciones para mejorar este trabajo; aun más por ser uno de mis mejores formadores como profesionista

Al Dr. Robert Bye por sus acertadas correcciones para este trabajo, por reafirmar que México, está lleno de maravillas.

A la Bióloga Bárbara Estrada por ser una linda persona y hacer más agradable mi estancia en el laboratorio, por su invaluable asistencia técnica para este trabajo.

Al Dr. Eduardo Aranda, por ser la semilla que origino este trabajo, por proporcionarme el material biológico, gracias por su asesoría.

A la M. en C. Laura Patricia Lina gracias por toda la ayuda con los bioensayos y por las correcciones para esta investigación

A la M. en C: Josefina Herrera Santoyo por aceptar ser mi sinodal, por sus acertadas correcciones para este proyecto

A mi mejor amiga Daniela Rebolledo Solleiro, gracias por tu amistad, por todo el apoyo moral por compartir parte de tu vida conmigo, por abrirme las puertas de tu casa.

A Israel Vargas por la edición del documento

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Características generales de la familia Convolvulaceae	5
1.2 El género <i>Ipomoea</i>	6
1.3 Ubicación taxonómica de <i>Ipomoea carnea</i> subsp. <i>fistulosa</i>	10
1.4 Características de <i>Ipomoea carnea</i>	10
1.5 Nombres comunes	11
1.6 Distribución	11
1.7 Usos	11
1.8 Importancia fitoquímica	11
1.9 El maíz	13
1.10 Origen del maíz	15
1.11 Producción de maíz en el mundo	17
1.12 Producción de maíz en México	18
1.13 Usos del maíz	19
1.14 <i>Spodoptera frugiperda</i> gusano cogollero del maíz	22
1.14.1 Ubicación taxonómica	22
1.14.2 Hospederos y distribución	22
1.14.3 Ciclo biológico	22
1.15 Insecticidas botánicos	23
1.16 Cultivo de tejidos vegetales	27
1.17 Micropropagación	31

1.17.1 Micropropagación vía organogénesis.....	32
1.17.2 Micropropagación vía embriogénesis somática	32
1.18 El cultivo de tejidos vegetales como fuente de metabolitos secundarios	33
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo general	37
3.2 Objetivos particulares.....	37
4 MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1 Material biológico	38
4.2 Desinfección de las semillas de <i>Ipomoea carnea</i>	38
4.3 Germinación	39
4.4 Inducción de brotación múltiple	40
4.5 Enraizamiento.....	42
4.6 Aclimatización.....	42
4.7 Cultivo de callo	42
4.8 Obtención de extractos	43
4.9 Bioensayo de toxicidad con <i>Spodoptera frugiperda</i>	43
4.10 Análisis estadístico.....	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1 Desinfección de las semillas de <i>Ipomoea carnea</i>	46
5.2 Germinación	49
5.2.1 Escarificación mecánica.....	51
5.2.2 Efecto de la luz y la oscuridad en las semillas de <i>Ipomoea carnea</i>	53
5.3 Inducción de brotación múltiple	54
5.3.1 Primera evaluación hormonal	54
5.3.2 Segunda evaluación hormonal	59
5.3.2.1 Formación de brotes a partir de nudos cotiledonares.....	59
5.3.2.2 Formación de brotes a partir de ápices de brote.....	64

5.3.2.3 Nudos cotiledonares y ápices de brote.....	68
5.4 Enraizamiento.....	70
5.5 Aclimatización.....	74
5.6 Cultivo de callo	79
5.7 Bioensayos	79
6. CONCLUSIONES.....	82
7. APÉNDICE	84
7.1 Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) 1962.....	84
7.2. Dieta para <i>Spodoptera frugiperda</i>	85
8. BIBLIOGRAFÍA.....	86

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Usos etnobotánicos de algunas especies del género <i>Ipomoea</i>	7
Tabla 2. Reportes de algunas especies del género <i>Ipomoea</i> que presentan actividad biológica.....	8
Tabla 3. Características de los insecticidas botánicos más importantes.....	24
Tabla 4. Algunas plantas que presentan actividad biológica propagadas por cultivo de tejidos vegetales.....	33
Tabla 5. Metabolitos secundarios bioactivos producidos por cultivo de tejidos.....	35
Tabla 6. Tratamientos hormonales para inducción de brotes a partir de cotiledones y nudos en medio MS adicionado con BAP y AIA, pH 5.7, 30 g/l de sacarosa, 5 g/l phytigel, 25 ±2 °C, 16 h luz / 8 h oscuridad.....	40
Tabla 7. Tratamientos hormonales para inducción de brotes a partir de ápice y nudos en medio MS adicionado con BAP y AIA, pH 5.7, 30 g/L de sacarosa, 5 g/L phytigel, 25 ±2 °C, 16 h luz / 8 h oscuridad.....	41
Tabla 8. Métodos de desinfección aplicados a las semillas de <i>Ipomoea carnea</i>	48
Tabla 9. Porcentaje de germinación de semillas escarificadas y no escarificadas de <i>Ipomoea carnea</i>	52
Tabla 10. Germinación de semillas de <i>Ipomoea carnea</i> en condiciones de luz 16 h y oscuridad. 25 ± 2 °C. Medio MS al 50% de sales, pH 5.7, 30 g/L de sacarosa y 5 g/L de phytigel.....	53
Tabla 11. Promedio de brotes por explante a los 28 y 63 días de cultivo a partir de nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> cultivados <i>in vitro</i> , en medio MS adicionado con AIA y BAP.....	58
Tabla 12. Promedio de brotes por explante a los 14, 24, 34, días de cultivo a partir de nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> cultivados <i>in vitro</i> , en medio MS adicionado con AIA y BAP.....	60
Tabla 13. Promedio de brotes por explante a los 10 y 20 días de que los nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> se aislaron del callo y se cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento.....	62
Tabla 14. Promedio de brotes por explante a los 14, 24 y 34, días de cultivo a partir de ápices de brote de <i>Ipomoea carnea</i> cultivados <i>in vitro</i> , en medio MS adicionado con AIA y BAP.....	66
Tabla 15. Promedio de brotes por explante a los 10 y 20 días de que los ápices de <i>Ipomoea carnea</i> se aislaron del callo y se cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento.....	67
Tabla 16. Formación de raíz <i>in vitro</i> en los brotes de <i>Ipomoea carnea</i> en medio MS al 50 % de sales, 30 g/l de sacarosa, 5 g/l phytigel, 25° C ±2, 16 h luz / 8 oscuridad.....	72
Tabla 17. Porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas evaluadas a los 60 días....	75
Tabla 18. Secuencia cronológica de la micropropagación de <i>Ipomoea carnea</i> , desde la germinación hasta la aclimatización, a partir del cultivo <i>in vitro</i> de nudos cotiledonares y ápices de brote en medio MS modificado.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Ipomoea carnea</i> con flor.....	10
Figura 2. Crecimiento y desarrollo del maíz	14
Figura 3. Los ocho centros de origen según N. I. Vavilov	15
Figura 4 Distribución de <i>Zea mays</i> subsps. <i>mays</i> y parientes silvestres.....	17
Figura 5. Rendimiento de maíz por hectárea (ton) (2003)	19
Figura 6. Los usos del maíz	21
Figura 7. Diagrama operativo para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Ipomoea carnea</i>	45
Figura 8. a) Semilla de <i>Ipomoea carnea</i> con tricomas b) Semilla de <i>I. carnea</i> sin tricomas	47
Figura 9. Semilla de <i>Ipomoea carnea</i> escarificada, germinación <i>in vitro</i> en medio MS al 50% de sales minerales	50
Figura 10. Porcentaje de semillas germinadas escarificadas y no escarificadas a los 2, 4 y 6 días de siembra en medio MS al 50% de sales.....	52
Figura 11. Formación de callo y raíces en nudos y cotiledones	56
Figura 12. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> en medio MS adicionado con AIA y BAP en 2 tiempos de evaluación.....	57
Figura 13. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> en medio MS adicionado con AIA y BAP a los 14, 24 y 34 días de cultivo	61
Figura 14. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de nudos cotiledonares de <i>Ipomoea carnea</i> sin callo en medio MS sin reguladores de crecimiento a los 10 y 20 días de cultivo.....	63
Figura 15. Brotes aislados.....	64
Figura 16. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de ápices de brote de <i>Ipomoea carnea</i> en medio MS adicionado con AIA y BAP en 3 tiempos de evaluación	65
Figura 17. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de ápices de <i>Ipomoea carnea</i> sin callo en medio MS sin reguladores de crecimiento en 2 tiempos de evaluación	67
Figura 18. Formación de brotes <i>in vitro</i> a partir de ápices y nudos de <i>Ipomoea carnea</i> en medio MS sin reguladores de crecimiento a los 20 días de aislado el callo.....	68
Figura 19. Formación de brotes en ápices y nudos de <i>Ipomoea carnea</i>	69
Figura 20. Individualización de un brote, crecimiento y desarrollo de raíces	73
Figura 21. Secuencia de la micropropagación de <i>Ipomoea carnea</i>	78

ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolácetico
BAP	6-bencilaminopurina
ANA	Ácido α -naftalenacético
cm	centímetros
DL₅₀	Dosis letal media
g	gramos
ha	hectáreas
h	horas
l	litro
m	metro (s)
mg	miligramos
μg	microgramos
ml	mililitros
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto
msnm	metros sobre el nivel del mar
MIP	Manejo Integral de Plagas
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

RESUMEN

En este trabajo se logró la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae), planta con potencial insecticida, a partir de nudos cotiledonares y ápices de brote. Para la propagación de esta especie, se establecieron condiciones de germinación; las semillas se escarificaron y cultivaron en medio MS al 50 % de sales en condiciones de fotoperiodo largo 16 h luz / 8 h oscuridad a $25^{\circ} \text{C} \pm 2$; obteniéndose el 100% de germinación a los cuatro días de cultivo, por lo que se determinó como necesaria la escarificación de las semillas de *I. carnea* para estimular y/o acelerar el proceso de germinación. Para la inducción de brotación múltiple se empleó el medio MS adicionado con distintas concentraciones de BAP (1.0, 2.5 y 4.0 mg/l) con AIA (0 y 1.0 mg/l) y se probaron diferentes explantes: cotiledones completos, nudos cotiledonares y ápices de brote, provenientes de las plántulas germinadas *in vitro* de 13 días de edad. Los cotiledones completos sólo generaron callo, mientras que los nudos cotiledonares y los ápices generaron brotes. La diferenciación y crecimiento de los brotes generados se logró eliminando el callo formado en la base de los explantes y colocándolos en medio MS sin reguladores de crecimiento durante 20 días. Al comparar la respuesta de los nudos y los ápices después de los 20 días se observó que la mayor formación de brotes se obtuvo a partir de los nudos cotiledonares, en donde se generaron en promedio 5.83 brotes por explante, en tanto que en los ápices de brote se formaron en promedio 2.67 brotes por explante.

La mejor respuesta en cuanto a número de brotes y organización del tejido para nudos cotiledonares se presentó en los explantes que habían estado en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de BAP y en ausencia de AIA. En el caso de los ápices de brote la combinación de 4 mg/l de BAP con 1 mg/l de AIA fue la que dio la mejor respuesta.

El enraizamiento de los brotes se realizó *in vitro* en medio MS al 50 % de sales, 30 g/l de sacarosa y sin reguladores de crecimiento. Para la aclimatización, los brotes enraizados se colocaron en charolas de plástico con una mezcla de sphagnum, agrolita y tierra de hoja en relación 1:1:1, se mantuvieron cubiertos con bolsas de plástico y se les redujo en forma gradual la humedad relativa mediante la perforación de las bolsas. La sobrevivencia de las plantas aclimatizadas fue del 100%

La actividad biológica insecticida de los extractos orgánicos hexánicos clorofórmicos y metanólicos de los callos derivados de *I. carnea* se evaluó mediante bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda*. La mortalidad de las larvas alcanzó el 91 % al emplear extractos metabólicos y el 87.5% con extractos clorofórmicos después .

El Cultivo de Tejidos Vegetales resultó ser una técnica eficiente para la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea*, especie con potencial bioinsecticida. El desarrollo de un protocolo de micropropagación es una alternativa nos brinda la posibilidad de establecer cultivos controlados en campo con los cuales haya un suministro de materia prima de calidad, en cantidades suficientes y de forma constante, para el estudio y producción de compuestos con actividad biológica sin poner en riesgo a la especie en cuestión.

INTRODUCCIÓN

La agricultura del siglo XXI se enfrenta a problemas sin precedentes. En los próximos 30 años habrá que alimentar a otros 2,000 millones de personas con una base de recursos naturales cada vez más frágil, una población mundial en vías de rápida urbanización exige a la agricultura una variedad mayor de atributos de calidad, no sólo en lo que respecta a los productos en sí, sino también a los métodos empleados para producirlos. El sector agrícola tendrá que responder a esa exigencia sin recurrir a la fórmula tradicional de aumentar la extensión de las áreas de cultivo y el empleo de insecticidas y fertilizantes sintéticos, tomando además en consideración la protección del patrimonio ecológico común, las preocupaciones de los consumidores por la inocuidad y calidad de los alimentos y la mejora de los medios de subsistencia rurales (FAO, 2004). En este sentido, México siendo el cuarto productor mundial de maíz se enfrenta al problema de tener el rendimiento promedio más bajo, apenas 2.6 toneladas por hectárea. Entre los factores que disminuyen el rendimiento del maíz se encuentran los insectos plaga que pueden causar pérdidas del 20% y hasta el 80% durante el ciclo vegetativo y el almacenamiento.

Actualmente, la forma más común de controlar las plagas agrícolas es la aplicación de agroquímicos, los cuales al no ser utilizados racionalmente representan un peligro para el ambiente y el ser humano. Por lo que se ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de plagas agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además impliquen un riesgo ambiental y sanitario bajo. Es así como surge un nuevo enfoque que al mismo tiempo retoma prácticas agrícolas antiguas y nuevas tecnologías ambientales seguras, se trata del Manejo Integral de Plagas (MIP). El MIP utiliza de forma simultánea y coordinada distintas formas de control, una de ellas es el empleo de sustancias químicas de origen biológico, de bajo impacto ambiental y alta aceptación en la agricultura orgánica, buscando aprovechar las moléculas sintetizadas por las plantas y microorganismos diseñadas después de siglos de co-evolución, para atacar patógenos específicos (Saad *et al.*, 2003), ejemplo de ello son las feromonas, los bioplaguicidas, jabones insecticidas e insecticidas botánicos o alomonas (extractos de plantas). En particular los insecticidas botánicos se obtienen o elaboran a partir de extractos vegetales de plantas silvestres, por lo que es difícil imaginar la obtención constante, homogénea y en cantidad de un recurso, que hasta la fecha se reproduce de manera silvestre o que se cultiva, sujeto a la variabilidad de las condiciones ambientales.

La biotecnología, a través de las tecnologías englobadas en el CTV nos permite obtener plantas libres de patógenos, realizar propagación masiva y mejoramiento genético, conservar germoplasma y producir metabolitos secundarios sin necesidad de tener una planta completa. Todo lo anterior lo podemos llevar a cabo de manera controlada y en cualquier época del año, facilitándonos la realización de estudios teóricos y prácticos de fisiología y bioquímica vegetal. En este contexto el CTV nos ofrece un estudio integral para la producción, caracterización y análisis de ingredientes con actividad biológica sentando la base para el desarrollo de productos de calidad estandarizada, novedosos y efectivos.

Ipomoea carnea Jacq. es una especie silvestre potencialmente importante en la agricultura por el potencial bioinsecticida de sus compuestos. En este trabajo se plantea su micropropagación y establecimiento *ex vitro* así como la evaluación del potencial bioinsecticida de extractos orgánicos de callos generados *in vitro* contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz).

RESUMEN

En este trabajo se logró la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae), planta con potencial insecticida, a partir de nudos cotiledonares y ápices de brote. Para la propagación de esta especie, se establecieron condiciones de germinación; las semillas se escarificaron y cultivaron en medio MS al 50 % de sales en condiciones de fotoperiodo largo 16 h luz / 8 h oscuridad a $25^{\circ} \text{C} \pm 2$; obteniéndose el 100% de germinación a los cuatro días de cultivo, por lo que se determinó como necesaria la escarificación de las semillas de *I. carnea* para estimular y/o acelerar el proceso de germinación. Para la inducción de brotación múltiple se empleó el medio MS adicionado con distintas concentraciones de BAP (1.0, 2.5 y 4.0 mg/l) con AIA (0 y 1.0 mg/l) y se probaron diferentes explantes: cotiledones completos, nudos cotiledonares y ápices de brote, provenientes de las plántulas germinadas *in vitro* de 13 días de edad. Los cotiledones completos sólo generaron callo, mientras que los nudos cotiledonares y los ápices generaron brotes. La diferenciación y crecimiento de los brotes generados se logró eliminando el callo formado en la base de los explantes y colocándolos en medio MS sin reguladores de crecimiento durante 20 días. Al comparar la respuesta de los nudos y los ápices después de los 20 días se observó que la mayor formación de brotes se obtuvo a partir de los nudos cotiledonares, en donde se generaron en promedio 5.83 brotes por explante, en tanto que en los ápices de brote se formaron en promedio 2.67 brotes por explante.

La mejor respuesta en cuanto a número de brotes y organización del tejido para nudos cotiledonares se presentó en los explantes que habían estado en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de BAP y en ausencia de AIA. En el caso de los ápices de brote la combinación de 4 mg/l de BAP con 1 mg/l de AIA fue la que dio la mejor respuesta.

El enraizamiento de los brotes se realizó *in vitro* en medio MS al 50 % de sales, 30 g/l de sacarosa y sin reguladores de crecimiento. Para la aclimatización, los brotes enraizados se colocaron en charolas de plástico con una mezcla de sphagnum, agrolita y tierra de hoja en relación 1:1:1, se mantuvieron cubiertos con bolsas de plástico y se les redujo en forma gradual la humedad relativa mediante la perforación de las bolsas. La sobrevivencia de las plantas aclimatizadas fue del 100%

La actividad biológica insecticida de los extractos orgánicos hexánicos clorofórmicos y metanólicos de los callos derivados de *I. carnea* se evaluó mediante bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda*. La mortalidad de las larvas alcanzó el 91 % al emplear extractos metabólicos y el 87.5% con extractos clorofórmicos después .

El Cultivo de Tejidos Vegetales resultó ser una técnica eficiente para la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea*, especie con potencial bioinsecticida. El desarrollo de un protocolo de micropropagación es una alternativa nos brinda la posibilidad de establecer cultivos controlados en campo con los cuales haya un suministro de materia prima de calidad, en cantidades suficientes y de forma constante, para el estudio y producción de compuestos con actividad biológica sin poner en riesgo a la especie en cuestión.

INTRODUCCIÓN

La agricultura del siglo XXI se enfrenta a problemas sin precedentes. En los próximos 30 años habrá que alimentar a otros 2,000 millones de personas con una base de recursos naturales cada vez más frágil, una población mundial en vías de rápida urbanización exige a la agricultura una variedad mayor de atributos de calidad, no sólo en lo que respecta a los productos en sí, sino también a los métodos empleados para producirlos. El sector agrícola tendrá que responder a esa exigencia sin recurrir a la fórmula tradicional de aumentar la extensión de las áreas de cultivo y el empleo de insecticidas y fertilizantes sintéticos, tomando además en consideración la protección del patrimonio ecológico común, las preocupaciones de los consumidores por la inocuidad y calidad de los alimentos y la mejora de los medios de subsistencia rurales (FAO, 2004). En este sentido, México siendo el cuarto productor mundial de maíz se enfrenta al problema de tener el rendimiento promedio más bajo, apenas 2.6 toneladas por hectárea. Entre los factores que disminuyen el rendimiento del maíz se encuentran los insectos plaga que pueden causar pérdidas del 20% y hasta el 80% durante el ciclo vegetativo y el almacenamiento.

Actualmente, la forma más común de controlar las plagas agrícolas es la aplicación de agroquímicos, los cuales al no ser utilizados racionalmente representan un peligro para el ambiente y el ser humano. Por lo que se ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de plagas agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además impliquen un riesgo ambiental y sanitario bajo. Es así como surge un nuevo enfoque que al mismo tiempo retoma prácticas agrícolas antiguas y nuevas tecnologías ambientales seguras, se trata del Manejo Integral de Plagas (MIP). El MIP utiliza de forma simultánea y coordinada distintas formas de control, una de ellas es el empleo de sustancias químicas de origen biológico, de bajo impacto ambiental y alta aceptación en la agricultura orgánica, buscando aprovechar las moléculas sintetizadas por las plantas y microorganismos diseñadas después de siglos de co-evolución, para atacar patógenos específicos (Saad *et al.*, 2003), ejemplo de ello son las feromonas, los bioplaguicidas, jabones insecticidas e insecticidas botánicos o alomonas (extractos de plantas). En particular los insecticidas botánicos se obtienen o elaboran a partir de extractos vegetales de plantas silvestres, por lo que es difícil imaginar la obtención constante, homogénea y en cantidad de un recurso, que hasta la fecha se reproduce de manera silvestre o que se cultiva, sujeto a la variabilidad de las condiciones ambientales.

La biotecnología, a través de las tecnologías englobadas en el CTV nos permite obtener plantas libres de patógenos, realizar propagación masiva y mejoramiento genético, conservar germoplasma y producir metabolitos secundarios sin necesidad de tener una planta completa. Todo lo anterior lo podemos llevar acabo de manera controlara y en cualquier época del año, facilitándonos la realización de estudios teóricos y prácticos de fisiología y bioquímica vegetal. En este contexto el CTV nos ofrece un estudio integral para la producción, caracterización y análisis de ingredientes con actividad biológica sentando la base para el desarrollo de productos de calidad estandarizada, novedosos y efectivos.

Ipomoea carnea Jacq. es una especie silvestre potencialmente importante en la agricultura por el potencial bioinsecticida de sus compuestos. En este trabajo se plantea su micropropagación y establecimiento *ex vitro* así como la evaluación del potencial bioinsecticida de extractos orgánicos de callos generados *in vitro* contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz).

1. ANTECEDENTES

1.1 Características generales de la familia Convolvulaceae

La familia Convolvulaceae incluye aproximadamente 40 géneros, dentro de los cuales se registran más de 1500 especies de distribución casi cosmopolita, aunque alcanza su mayor diversidad en latitudes tropicales. Las convolvuláceas son mejor conocidas por su hábito trepador pero varias especies se presentan en forma arbórea, arbustiva, o como hierbas erectas o postradas. Frecuentemente provistas de látex. La floración ocurre en el invierno. Las flores son tubulares y de colores brillantes, generalmente de duración efímera, limitándose a las horas matinales. Se encuentran en habitats soleados y abiertos (Mc Donald, 1997).

En México, están representadas aproximadamente 250 especies que pertenecen a 15 ó 17 géneros de los 40 que forman a la familia (Mc Donald, 1992). En ambos casos, el mayor número de especies pertenece al género *Ipomoea*.

La importancia económica de las convolvuláceas es considerable, podemos mencionar a *Ipomoea batatas* (camote) como la especie más importante por ser una planta cultivada a escala mundial. En México varias especies son fuente de medicamentos purgativos, tal como *I. jalapa*. Otras especies producen semillas que al ingerirse son alucinógenas (*Turbina corymbosa* e *Ipomoea tricolor*) y que aún se usan como medio adivinatorio en las tradiciones indígenas zapotecas. Probablemente más de la mitad de las especies de las convolvuláceas tienen potencial hortícola, muchas de ellas se cultivan en jardines y huertos familiares en gran parte de México (Mc Donald, 1997).

A nivel popular y en especial entre los habitantes de las comunidades rurales a lo largo de Mesoamérica y de América tropical, se le denomina “la familia de las campanas o campanillas” por la forma de campana que tienen sus flores, son muy conocidas en el campo y tienen gran importancia etnobotánica para las diferentes culturas (Flores *et al.*, 1997)

1.2 El género *Ipomoea*

El género *Ipomoea* es el más grande de las convolvuláceas, comprende aproximadamente 500 especies en el mundo, presenta distribución pantropical, con algunos taxa en regiones templadas. Se encuentra en bosques tropicales caducifolios o perenifolios, encinares, pinares, pantanos, dunas costeras y matorrales. Se distribuye desde el nivel del mar hasta los 3,200 msnm (Mc Donald, 1997). Para México se han reportado, aproximadamente, 170 especies con gran variabilidad morfológica (Mc Donald, 1997).

El grupo se distingue por tener un solo estilo, el estigma capitado, polen espinoso y cápsulas valvulares. La mayoría de las especies son enredaderas herbáceas o leñosas, pero también pueden presentarse en forma de árboles, arbustos, arbustivos sufrutescentes, o hierbas escandentes o erectas. La gran variedad de vectores polinizantes que incluye abejas, colibríes, lepidópteros, escarabajos y murciélagos, ha dado lugar a los variados tamaños, formas, colores, fenología, y morfología general de las corolas (Mc Donald, 1997).

Destaca la utilidad de algunas especies de Ipomeas como elemento ritual en las prácticas de la medicina tradicional. La madera en descomposición de *I. murucoides* sirve como sustrato para el crecimiento de hongos, alimento muypreciado durante la época de lluvias en varias regiones del país. Otras especies son fuente para la producción de miel, se utilizan como cercas vivas en los campos de cultivo y son un recurso natural para insectos, aves y mamíferos ya que les proporcionan alimento y/o protección estacionalmente (**Tabla 1**) (Murguía, 1995).

Las semillas de *Ipomoea violacea* y de *I. tricolor* se toman en diversos rituales con fines adivinatorios, para diagnosticar una enfermedad y para encontrar a alguien o algo perdido por los grupos indígenas chinantecos y mazatecos.

Tabla 1. Usos etnobotánicos de algunas especies del género *Ipomoea*

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	USO	ACTIVIDAD	REFERENCIA
<i>I. alba</i>		Ornamental		Murguía, 1995.
<i>I. arborescens</i>	Cazahuate Blanco	Medicinal	Bajar fiebre Males del corazón Dolor de muelas Dolor de bazo Parálisis Hidropesía	Valdez, 1999.
<i>I. batatas</i>	Camote, Uaisa Is Boniato	Alimenticio Medicinal	Raíz comestible Hojas en cataplasma para tumores inflamatorios	Flores <i>et al.</i> , 1997.
<i>I. carnea</i>	Amapola Flor de la mañana	Ornamental Melífera	-----	Flores <i>et al.</i> , 1997. Murguía, 1995.
<i>I. hederifolia</i>	Alambrillo	-----	Forraje	Flores <i>et al.</i> , 1997.
<i>I. intrapilosa</i>	Cazahuate blanco	Medicinal	Padecimientos reumáticos Dolor de oídos y muelas Problemas gastrointestinales Purgativo Anticancerígeno Ahuyentar insectos domésticos	Arqueta, 1994. Howard, 1981. Osuna, 1994.
<i>I. murucoides</i>	Cazahuate prieto	-----	Tóxica para el ganado Sustrato para hongos	Matuda, 1964. Murguía, 1995.
<i>I. orizabensis</i>	Jalapa macho	Medicinal	Purgante	Flores <i>et al.</i> , 1997.
<i>I. pes-caprae</i>	Riñonina, Bejuco	Medicinal	Medicinal para afecciones renales Cataplasma para tumores y dolor reumático Fijadora de suelo	Flores <i>et al.</i> , 1997.
<i>I. purga</i>	Raíz de Jalapa	Medicinal	Purgante Contra el reumatismo, Constipación Dolor y cólico en el intestino	Flores <i>et al.</i> , 1997. Linajes <i>et al.</i> , 1994.
<i>I. tricolor</i>	-----	Ritual Ornamental	Alucinógeno Semilla puede contener LSD	Flores <i>et al.</i> , 1997. Murguía, 1995. Spoerke y Smolinske, 1990.
<i>I. stans</i>	-----	Medicinal	Tratamiento: males hepáticos Nefritis Oftalmia Parálisis Antiespasmódico Sedativo	Aguilar, 1999.
<i>I. violacea</i>	-----	-----	Semilla puede contener LSD	Spoerke y Smolinske, 1990.

Estudios farmacológicos en extractos de diferentes convolvuláceas han reportado efectos antimicrobianos, analgésicos, espasmódicos, espasmolíticos, hipotensivos, insecticidas, psicomiméticos y anticancerígenos (Noda *et al.*, 1998). Las investigaciones químicas han mostrado que, los alcaloides polihidroxilados, tropanicos, indólicos, como las calisteginas y las resinas glicosídicas son los constituyes biológicamente activos más comunes en las Convolvuláceas (Asano *et al.*, 2001; Bieber *et al.*, 1986; Schimming *et al.* 2005).

Se han realizado diversos estudios en plantas del género *Ipomoea*, determinando algunos compuestos en especies como, *I. cairica*, *I. bahiensis*, *I. stans*, *I. carnea*, *I. intrapilosa*, entre otras; con actividad biológica larvicida, antimicrobiana, antitumorífica, etc.

En la **Tabla 2** se presentan algunos trabajos relacionados con aspectos fitoquímicos, biotecnológicos y de actividad biológica realizados en varias especies del género *Ipomoea*.

Tabla 2. Reportes de algunas especies del género *Ipomoea* que presentan actividad biológica

Especie	Compuesto activo	Actividad biológica	Referencia
<i>I. cairica</i>	*Ácidos caffeoylquinic ^Aceite esencial	*Anticonceptiva ^Larvicida	Ferreira <i>et al.</i> , 2006. Thomas <i>et al.</i> , 2003.
<i>I. carnea</i> subs. <i>fistulosa</i>	*Alcaloides polihidroxilados Suansonina y Calisteginas.	Despolarizante Acción similar a una succinilcolina Efecto positivo en la respuesta cardiaca y respiratoria Insecticida *Toxica para cabras borregos y vacas lecheras	Abdelhadi <i>et al.</i> , 1989. Bachhav <i>et al.</i> , 1999. Haraguchi <i>et al.</i> , 2003. Saxena y Sumithra 1985 en (Dev y Koul, 1997)
<i>I. bahiensis</i>	Glicósidos	Antimicrobiana Antitumorífica probada en ratón	Bieber <i>et al.</i> , 1986.
<i>I. intrapilosa</i>	-----	Antiespasmódica Inhibición no selectiva de la respuesta contráctil inducida <i>in</i> <i>vitro</i> por serotonina en músculo liso de útero de rata.	Osuna <i>et al.</i> , 1996. Perusquía, 1995.

Continuación tabla 2

<i>I. lonchophylla</i>	Glicósidos de la resina	Tóxica para ratón	Mcleod y Ward, 1997.
<i>I. orizabensis</i>	6 glicosidos: escamominas I y II 4 tetrasacáridos del ácido jalapινόlico	Citotoxicidad ligera al carcinoma epidérmico oral en humano	Hernández-Carlos <i>et al.</i> , 1999.
<i>I. pes-caprae</i>	* β -damascenona y E-Fitol	Efecto inhibitorio en la síntesis de prostaglandinas <i>in vitro</i> *Actividad antiespasmódica Anticonceptiva	De Souza <i>et al.</i> , 2000. Pongprayoon <i>et al.</i> , 1991 y 1992.
<i>I. riedelii</i> e <i>I. sericophylla</i>	Suansonina	Tóxica para las cabras Inhibición de la α -manosidasa lisosomal y la manosidasa II de Golgi	Barbosa <i>et al.</i> , 2006.
<i>I. sp</i>	-----	Amebicida	Chu <i>et al.</i> , 1998.
<i>I. sp</i> Q6	Suansonina Calistegina B2	Inhibidores de glicosidasas específicas Extractos de semillas inhibidores de β -glucosidasa y α -galactosidasa.	Molyneux <i>et al.</i> , 1995.
<i>I. stans</i>	*Fracciones de polisacáridos aislados de raíces	Anticonvulsiva *Citotóxica en 3 líneas celulares de tumores humanos, carcinoma C. nasofaríngeo, C. de colon C. de cervix Antibiótica específica: en <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .	Navarro-Ruiz <i>et al.</i> , 1996. Reynolds <i>et al.</i> , 1995.
<i>I. tricolor</i>	Glicoresina Tricolorina A	Potencial alelopático Inhibición de crecimiento en plantas Antimicrobiana	Davies-Coleman y Rivett, 1989. Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1993.

1.3 Ubicación taxonómica de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa*

Familia Convolvulaceae

Género *Ipomoea*

Especie *Ipomoea carnea*

1.4 Características de *Ipomoea carnea*

Arbustos ramificados de la base, perennes. **Tallos** rectos, rollizos de 2 a 4 m de largo, leñosos, lisos, costillados o estriados, verdes o grises, huecos, glabros o puberulentos.

Raíces tuberosas. **Hojas** simples, deciduas, pecioladas, verdes en ambas superficies; lámina ovada, ovado-elongada y atenuada hacia el ápice, membranácea, subcoriácea, glabra o raramente puberulenta en ambas superficies, márgenes enteros. **Inflorescencias** en cimas axilares. **Fruto** una cápsula, parda al secarse, cónica, dehiscente, ligniscente, glabra. **Semillas** pardas, oscuras o grises, elipsoides, triangulares, 1.0-1.2 cm de largo, 5-9 mm de ancho, tomentosas, pelos gris oscuro, 3-14 mm de largo. La **floración** puede comenzar en noviembre y terminar en mayo (Mc Donald, 1997).



Figura 1. Planta de *Ipomoea carnea* con flor

1.5 Nombres comunes

Según el reporte de Flores *et al.* (1997) en los estados de Guerrero, Chiapas y Oaxaca a *Ipomoea carnea* le llaman amapola y en Tamaulipas le dicen flor de la mañana. También se le conoce como quiebraplatos, hokol kat, chokob-kat, chococat, choco-kati y palo santo de Castilla.

1.6 Distribución

Se distribuye en el Sur de Estados Unidos (Texas) y regiones tropicales cálidas de México (Sinaloa, Tamaulipas, San Luís Potosí, Morelos, Veracruz, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Guerrero, Oaxaca y Chiapas), América Central y Sudamérica (Flores *et al.*, 1997).

Se puede encontrar en la selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, selva baja caducifolia, dunas costeras, pantanos, zonas urbanas y zonas secundarias derivadas de estos tipos (Flores *et al.*, 1997).

1.7 Usos

Ipomoea carnea tiene un amplio uso ornamental en el estado de Yucatán y en la medicina tradicional el látex se utiliza para quitar verrugas (Flores *et al.*, 1997).

1.8 Importancia fitoquímica

Ipomoea carnea ha sido frecuentemente investigada por causar fuertes intoxicaciones e incluso la muerte del ganado que se alimenta de ella de forma prolongada, pues los compuestos químicos de esta planta afectan el sistema nervioso central.

En 2001 Asano y colaboradores aislaron de las partes aéreas de *I. carnea* diferentes alcaloides; dos calisteginas denominadas B1 y B2, suansonina y un alcaloide, el dihidroxintropano. Por su parte Haraguchi y colaboradores (2003) aislaron y caracterizaron alcaloides polihidroxilados de las hojas, flores y semillas de *Ipomoea carnea*. La separación cromatográfica del extracto de la hoja resultó en el aislamiento de la suansonina, potencial inhibidor de la α -manosidasa II lisosomal y de Golgi, cuatro calisteginas B1, B2, B3, y C1 y 2-

epi-lentiginosina. Al realizar pruebas de inhibición en glicosidasas lisosomales preparadas a partir de epidídimos de rata, encontraron que las calisteginas, B1, B2 y C1 mostraban una potente actividad inhibitoria contra la β -glucosidasa lisosomal de rata. La calistegina B3 fue un inhibidor moderado de las α - y β -manosidasas, mientras que la suansonina tuvo un poderoso efecto inhibitorio en la α -manosidasa lisosomal.

Hueza y colaboradores (2003) reportaron que la suansonina inhibe la α -manosidasa lisosomal ocasionando la acumulación lisosomal de oligosacáridos que no terminaron de ser procesados, pérdida de la función celular e incluso la muerte de las células, esto se ha observado en diferentes órganos, incluyendo la tiroides, hígado y principalmente el sistema nervioso central. Además se sabe que la suansonina también inhibe la manosidasa II de Golgi que está involucrada en el metabolismo de adición de nitrógeno en las glicoproteínas. La alteración resultante en la síntesis, procesamiento y transporte de las glicoproteínas causa disfunción en la adhesión celular de moléculas, hormonas y algunos receptores de membrana. El efecto de estas alteraciones se aprecia clínicamente como embriogénesis anormal, función endocrina y gastrointestinal anormal y alteración del sistema inmune.

De acuerdo con Schimming *et al.* (2005) una de las particularidades de *Ipomoea carnea* y otras Ipomeas es la co-ocurrencia de las calisteginas (alcaloides polihidroxiados no tropánicos) y la suansonina, un alcaloide indolizídico polihidroxiado bien conocido en algunas especies de Fabáceas. Ambos compuestos se han encontrado en las semillas de dos Ipomeas australianas, *I. polpha* e *I. sp.Q6* Aff. *calobra* y en las hojas (partes aéreas) de *I. carnea subs. fistulosa*, especie pantropical originaria de América.

Los alcaloides polihidroxiados son metabolitos secundarios que parecen estar restringidos a dos familias cercanamente relacionadas, Solanaceae y Convolvulaceae.

Se considera que estos compuestos pueden ser inhibidores potentes y altamente selectivos de algunas glicosidasas por lo que se ha puesto mucho interés en ellos como una herramienta para estudiar el reconocimiento celular y como potenciales agentes terapéuticos (antivirales, anticancerígenos y antidiabéticos) (Watson *et al.*, 2001). Desde el punto de vista económico dichos componentes pueden causar intoxicación en el ganado, también son tóxicos para los vertebrados, insectos y microbios. Aún más, presentan efectos antialimentarios contra lepidópteros (Schimming *et al.*, 2005).

Aunque se ha reportado que varios alcaloides polihidroxiados presentan una actividad anticancerígena, algunas investigaciones se han concentrado en desarrollar la suansonina como una droga candidata para el tratamiento de algunas enfermedades humanas. La suansonina inhibe el crecimiento de las células de los tumores y previene la diseminación de las células malignas del tumor primario hacia sitios secundarios, proceso conocido como metástasis (Watson *et al.*, 2001).

Con respecto a la actividad insecticida se han realizado dos trabajos en los que se evidencia el potencial de *Ipomoea carnea*. Saxena y Sumithra en 1985 (citado en Dev y Koul, 1997), mencionan la propiedad insecticida del extracto de las hojas de *I. carnea*, el cual causaba la mortalidad de *Anopheles stephensi* en un 75%. Toledo (2001) probó extractos orgánicos de hojas y flor en botón contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) obteniendo más del 90% de mortalidad de las larvas.

Las investigaciones en torno al control de insectos plagas del maíz resultan de gran relevancia para la economía mundial pues se calcula que pueden causar pérdidas del 20% y hasta el 80% durante el ciclo vegetativo y el almacenamiento.

1.9 El maíz

Zea mays es una especie monocotiledónea anual, pertenece a la familia Poaceae (gramíneas). A diferencia de los demás cereales, es una especie monoica, lo que significa que sus inflorescencias, masculina y femenina, se ubican separadas dentro de una misma planta; esto determina además que su polinización sea fundamentalmente cruzada (**Fig. 2**) (http://www.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/maiz.htm).

La palabra maíz es de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». El maíz, que es junto con el trigo y el arroz, es uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación (FAO, 1993).

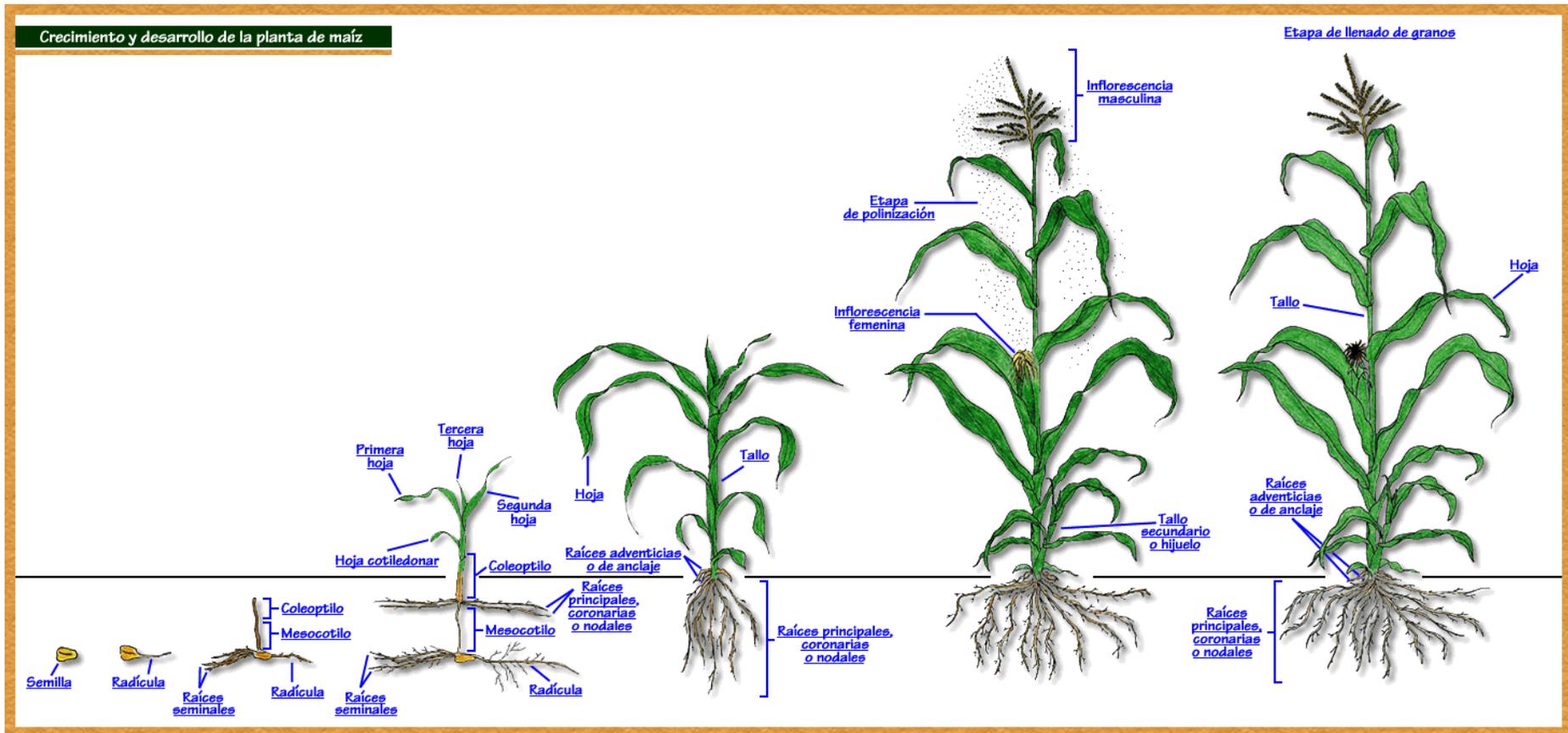


Figura 2. Crecimiento y desarrollo del maíz

1.10 Origen del maíz

La evidencia más antigua de la existencia del maíz se ubica en el Valle San Juan de Tehuacán, en la denominada Mesa Central de México a 2,500 msnm. En este lugar se han encontrado restos arqueológicos de plantas de maíz que se estima, datan del 7,000 a.C. Aunque lo antes mencionado goza de una aceptación general, no se descarta la posibilidad de centros secundarios de origen y/o adaptación en Sudamérica (Barros y Buenrostro,, 1997). Acainsumos <http://www.acainsumos.com.ar/Productos>

Nikolai Vavilov (citado en Ortiz y Otero, 2006) al buscar los centros de origen de varias especies cultivadas identificó ocho centros de origen en el planeta (**Fig. 3**), entre los que se encuentra la región mesoamericana que abarca el sureste de México y parte de Centroamérica. El sureste de México y Centroamérica es considerado el centro de origen y diversificación de varios cultivos, como el maíz, el chile, la calabaza, el frijol, la papaya, la guayaba, el algodón, el tabaco, el cacao y el tomate entre otros (Ortiz y Otero, 2006), (**Centro 7 en Fig.3**).



Figura 3. Los ocho centros de origen según N. I. Vavilov

Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones Maya y Azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente sembrarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. El maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para actividades agrícolas y que se recoge en algún lugar del planeta todos los meses del año. Crece desde los 58° de latitud norte en el Canadá y Rusia, hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4,000 metros de altura en los Andes peruanos (FAO, 1993).

El maíz es una planta que ha evolucionado en conjunto con el desarrollo de las civilizaciones en México. Hoy en día este cultivo ocupa un lugar preponderante en la producción agrícola del país, así como en la vida de las poblaciones indígenas y de los agricultores de pequeña escala. Actualmente se reconocen 60 razas y muchas más subrazas y variedades locales (Álvarez-Buylla, 2004). Además del maíz y su diversidad de razas y variedades, en nuestro territorio existen especies silvestres que genéricamente se conocen con el nombre de teocintle: *Zea mays subsp. mexicana*, *Z. mays subsp. parviglumis*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, *Z. luxurians*, *Z. huhuetenanguensis*, *Z. nicaraguensis* esta última de distribución en Centroamérica (**Fig. 4**). Esta gran riqueza genética se debe no sólo a la gran diversidad de climas y ecosistemas, sino a la diversidad cultural de México (Ortiz y Otero 2006).

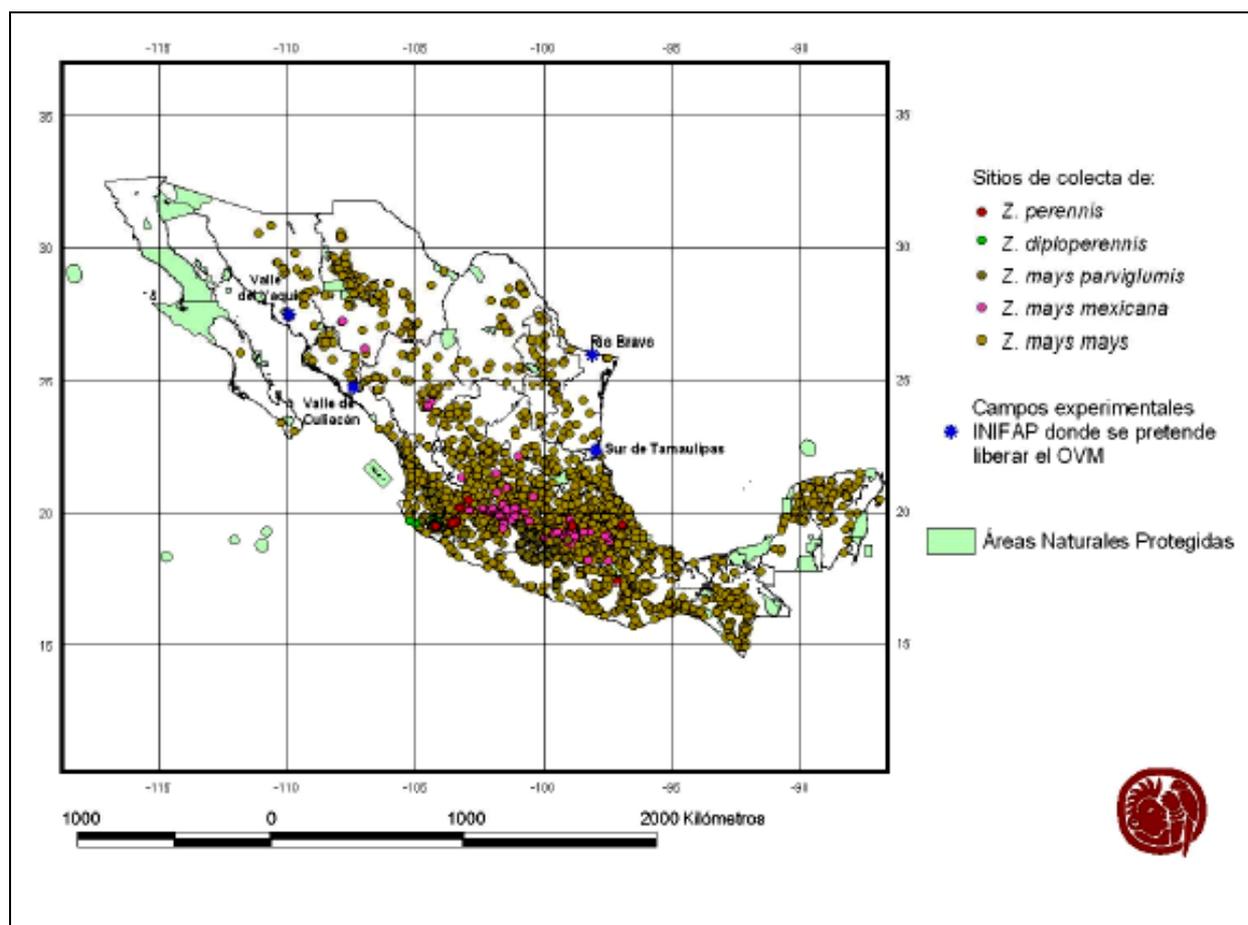


Figura 4 Distribución de *Zea mays* subsps. *mays* y parientes silvestres

1.11 Producción de maíz en el mundo

El maíz comenzó a ser cultivado por el hombre en América Central hace unos 6,000 a 10,000 años. Se difundió en el resto del mundo en los siglos XVI a XVIII, incluyendo África al sur del Sahara (FAO, 1993)

En la actualidad el maíz se produce en la mayoría de los países del mundo y es el tercer cereal más cultivado después del trigo y el arroz. Moderadamente, su uso se ha extendido por casi todo el mundo y ha adquirido una importancia fundamental en la economía agrícola de países de los cinco continentes. A raíz de la obtención de nuevos híbridos y de la selección de variedades de máximo rendimiento, amplias zonas de terreno, que hasta entonces habían permanecido al margen de la explotación agrícola, se destinaron al cultivo de este cereal.

Cerca del 66% de la cosecha global de maíz se usa para la alimentación de ganado, 20% es consumido directamente por humanos, 8% es usado en procesos industriales de alimentos y productos no alimenticios y 6% se usa como semilla y entre las naciones en vías de desarrollo.

Este grano es materia prima en una gran diversidad de procesos para obtener un sinnúmero de productos industriales utilizados en diferentes actividades económicas tales como la minería, textil, electrónica, farmacéutica, alimentaria, combustibles, bebidas, etc. Actualmente es considerado como el recurso renovable mas importante del mundo, cada año a nivel mundial de cada 4 ha sembradas se dedican a este cultivo 1.5 ha.

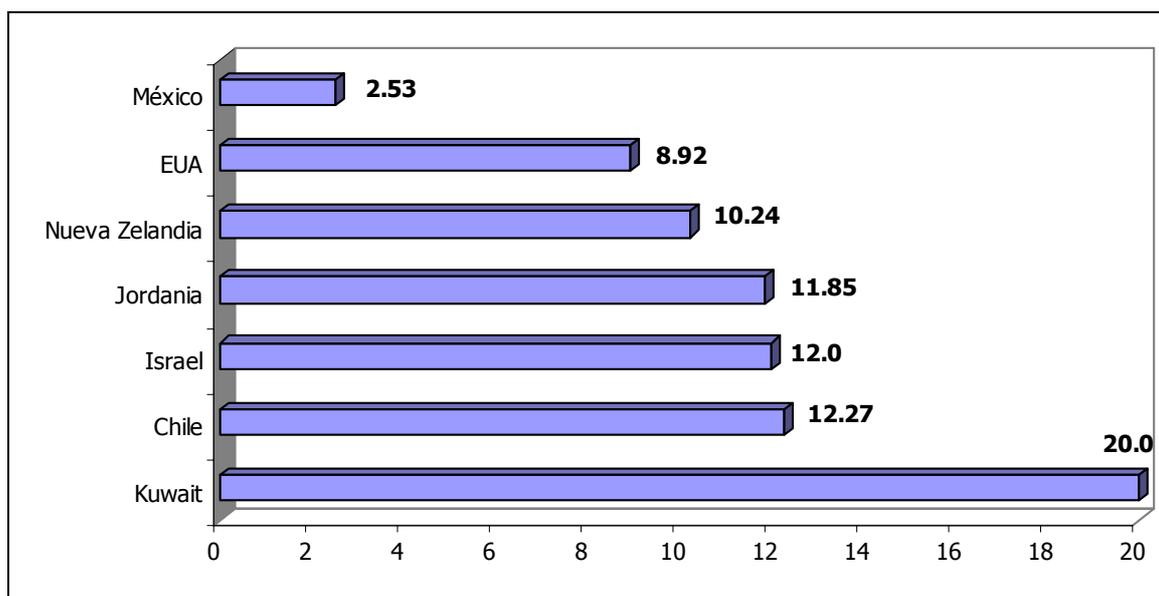
1.12 Producción de maíz en México

La producción de maíz en México constituye una de las actividades más importantes del sector rural, no sólo en términos de uso del suelo, sino que también en el empleo y el suministro de alimentos a la población rural y urbana del país; tiene además el valor agregado de representar un nicho de oportunidades debido a que es la segunda fuente de usos industriales después del petróleo por su gran cantidad de derivados. El cereal es de tal importancia social y económica en México que se siembra en poco más de 50% de la superficie agrícola del país; representa 60.7% del volumen de producción de granos básicos (maíz, trigo, arroz, frijol, soya, ajonjolí, cártamo, algodón, cebada y sorgo) e incluye 74% del número de productores beneficiados por el Programa de Apoyos Directos al Campo (PROCAMPO) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). La producción y comercialización del maíz, emplea a 2.2 millones de mexicanos (Anónimo, 2005).

México es el cuarto productor mundial de maíz al producir casi 19 millones de toneladas anuales, y ocupa el primer lugar en la producción de maíz blanco, sin embargo, se enfrenta al problema de tener el rendimiento promedio más bajo, apenas 2.5 toneladas por hectárea (**Fig. 5**) (Anónimo, 2005).

Entre los factores que disminuyen el rendimiento del maíz se encuentran los insectos plaga que pueden causar pérdidas del 20% y hasta el 80% durante el ciclo vegetativo y el almacenamiento. Las principales plagas del maíz son: el gusano cogollero del maíz, el gorgojo del maíz y el barrenador mayor de los granos (Lagunes, 1994).

Figura 5. Rendimiento de maíz por hectárea (ton) (2003)



Fuente: FAO, 2004 FAOSTAT

1.13 Usos del maíz ¹

El maíz tiene tres aplicaciones posibles: alimento, forraje y materia prima para la industria.

Los mexicanos han sabido aprovechar toda la planta del maíz, por ejemplo, el jugo de la caña verde se emplea como golosina y para preparar bebidas fermentadas, las hojas también verdes se emplean para envolver las corundas hechas de masa de maíz, los granos de maíz frescos o secos, enteros o molidos se emplean para elaborar la masa para tamales, tortillas, gorditas, entre otros antojitos, también se prepara pinole, pozole, atole, bebidas refrescantes y son complemento de otros platillos. El hongo del maíz conocido como cuitlacoche es uno de los más sabrosos y apreciados, se utiliza en varios guisos. En la medicina tradicional la infusión de los cabellos del elote se emplean como diurético. El uso del maíz no se limita a los alimentos también se utiliza para hacer arte y artesanías (**Fig. 6**) (Barros y Buenrostro, 1997). Tras la recolección del grano, los agricultores utilizan las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores para alimentar a los rumiantes.

Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos.

¹ Información tomada de FAO 1993

En la industria alimentaria, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede elaborar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina y harina fina, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos; se debe notar que el maíz cultivado en la agricultura de subsistencia continúa siendo utilizado como cultivo alimentario básico.

En lo que respecta a su aplicación como forraje, en los países desarrollados más del 60 por ciento de la producción se emplea para elaborar forrajes compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes. La planta tierna, se ha utilizado con gran éxito en la industria láctea y cárnica.

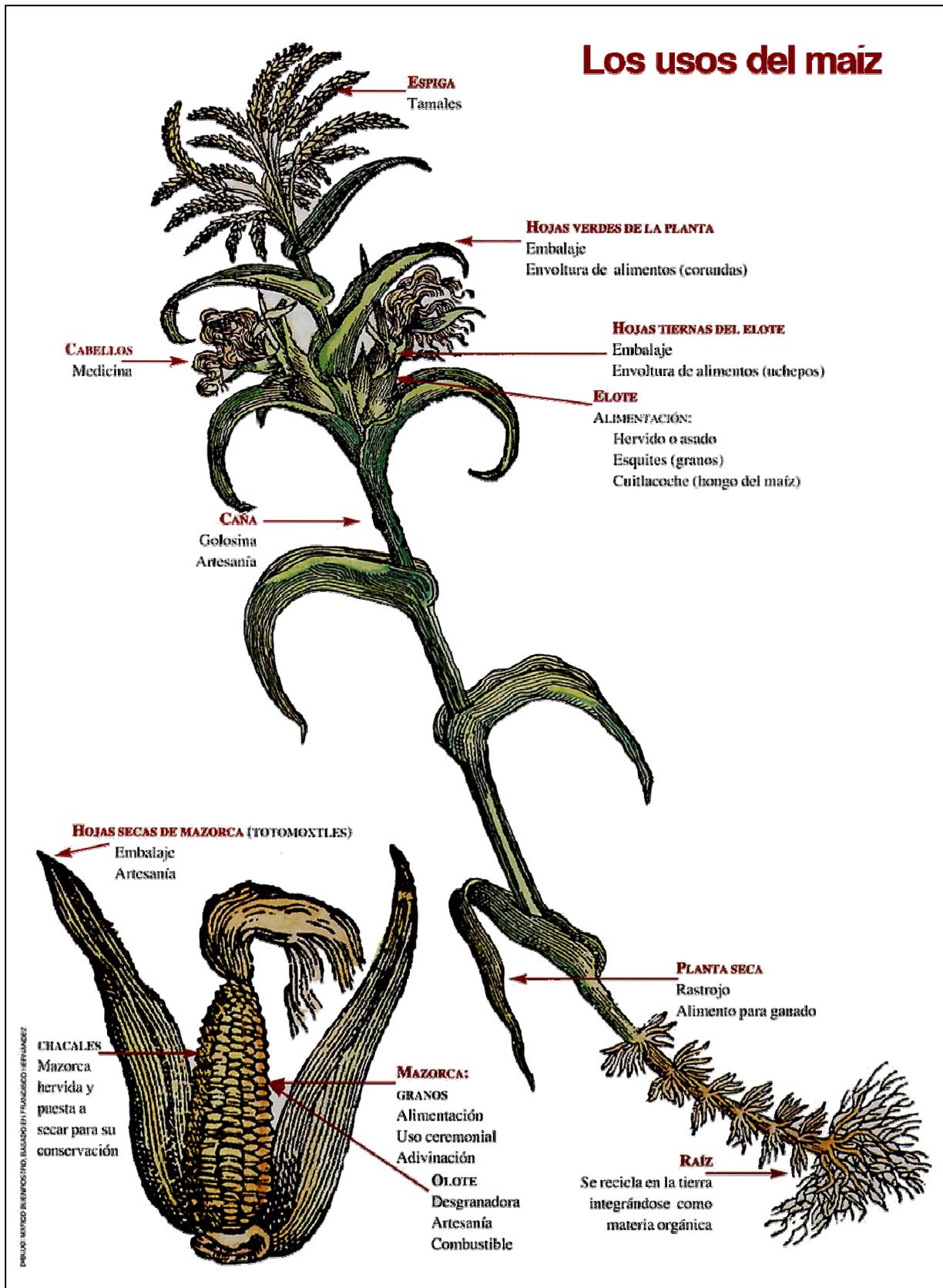
En la industria de transformación es una materia prima básica con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco subproductos como solventes industriales, sustancias para producir envases, textiles y combustible. Estado Unidos ha desarrollado tres procesos tecnológicos basados en este cultivo. El primero es el jarabe de alta fructosa, un edulcorante más dulce que la sacarosa; el segundo es el bioetanol, sustituto o aditivo de la gasolina, y el tercero es el ácido láctico, a partir del cual se pueden fabricar envases y textiles, entre otros productos.

El olote es una parte poco utilizada, en las comunidades rurales se emplea ya seco como combustible y en la industria se puede obtener un compuesto llamado furfural, solvente que se utiliza para realizar extracciones de aceite en diversas industrias.

La producción de maíz ha crecido significativamente debido en parte al aumento de las tierras cultivadas con el cereal, aunque sobre todo gracias a mejoras genéticas a la aplicación de técnicas más eficientes y a la utilización de fertilizantes, así como a la introducción de variedades nuevas con mayor capacidad de reproducción.

El cultivo de maíz es muy importante en el contexto cultural y agrícola en México sin embargo los agricultores deben combatir las enfermedades, malezas e insectos plaga que atentan contra el óptimo desarrollo de los maizares en nuestro país. Destacando como insecto plaga el gusano cogollero del maíz.

Figura 6. Los usos del maíz



Fuente: Revista Arqueología Mexicana No. 25 Vol V Año 1997.

1.14 *Spodoptera frugiperda* gusano cogollero del maíz

1.14.1 Ubicación taxonómica

Clase: Hexapoda

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctunidae

Género: *Spodoptera*

Especie: *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith 1797

1.14.2 Hospederos y distribución

El gusano cogollero del maíz se distribuye desde Los Estados Unidos de América hasta América del sur y El Caribe, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. En México puede estar presente en todas las regiones maiceras.

Este lepidóptero tiene preferencia por el maíz pero también ataca jitomate, sorgo, alfalfa, frijol, cacahuate, papa, nabo, camote espinaca, fresa, vid, y zacates en general (Carcia, 1992).

1.14.3 Ciclo biológico

Spodoptera frugiperda es un insecto holometábolo, es decir, pasa por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Los huevecillos son esféricos o semiesféricos cuya coloración varía de blanco a verde oscuro. Son depositados en grupos de 10 a 300 con un promedio de 150 por insecto en las hojas en la parte cercana al cogollo. El periodo de incubación varía entre 2 y 5 días dependiendo de la temperatura.

La larva, por lo general pasa por seis estados larvales. Al nacer es blanca con la cabeza negra y una longitud de 3 a 5 mm. Se desarrolla rápidamente y el cuerpo toma una coloración oscura. Cuando alcanza su completo desarrollo tiene una longitud de 3.5 a 4.0 cm. El tiempo que requiere para completar su desarrollo varía de 19 a 32 días.

Al emerger las larvas, éstas se encuentran aglomeradas en una pequeña porción de la hoja de maíz; mismo sitio del que se alimentan sin llegar a perforar la hoja. Los daños se inician cuando las larvas llegan al segundo instar y se dirigen al meristemo apical o cogollo de la planta, del cual se alimentan. Los daños se manifiestan como desgarramientos, agujeros irregulares e incluso excremento en forma de aserrín (Carcia 1992).

Osorio (1949), menciona que además del daño al cogollo, la larva puede atacar tardíamente a la espiga cuando ésta aún se encuentra envuelta en las últimas hojas. Al alimentarse de las inflorescencias masculinas causa una reducción en la producción de polen que provoca una fecundación deficiente y escasa formación de grano. La larva del último instar puede actuar como trozador al alimentarse de la base del tallo de plantas pequeñas o barrenando el tallo de plantas en desarrollo (Carcia, 1992).

El gusano cogollero del maíz como muchos otros insectos plaga son en su mayoría controlados por agentes químicos. Actualmente se buscan alternativas eficientes al control químico y que además impliquen un riesgo ambiental y sanitario bajo como podrían ser los insecticidas botánicos.

1.15 Insecticidas botánicos

Con en el desarrollo de la agricultura llegaron también las plagas, por lo que el ser humano tuvo que utilizar su ingenio para combatir a estos organismos nocivos y seguir recogiendo sus cosechas. Los principales métodos de lucha estaban basados en la aplicación de prácticas mecánicas (eliminación de las plantas enfermas, selección de semillas, labrado), junto con el uso de algunas sustancias químicas como azufre, arsénico, y aceite de oliva (Primo, 1991). Los insecticidas botánicos han sido usados por varios siglos y se conocían en las culturas tradicionales o tribales alrededor de todo el mundo, antes de ser introducidos a Europa o Estados Unidos. Algunos con mayor historia de uso tradicional son el árbol de Neem en India, rotenona en el este de Asia y Sudamérica, piretrinas en Persia (Irán) y cebadilla en Centro y Sudamérica (**Tabla 3.**), (Weinzierl, 2000).

Tabla 3. Características de los insecticidas botánicos más importantes

INSECTICIDA BOTÁNICO	FUENTE VEGETAL	MODO DE ACCIÓN Y TOXICIDAD	USOS
Piretrum/ Piretrinas	Flores de <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Interfiere con el movimiento de iones Na ⁺ y K ⁺ en los axones nerviosos. DL ₅₀ oral y dérmica en mamíferos mayor de 1,000; pueden ocurrir algunas reacciones alérgicas en humanos y otros mamíferos	En mascotas y humanos para control de pulgas, garrapatas y piojos. Usado sinérgicamente como aerosol en hogares y plantas comestibles. Se degrada rápidamente. Mezclado con otras plantas más estables para el campo y jardín
Rotenona	Raíces de <i>Derris</i> , <i>Lonchocarpus</i> y otras leguminosas tropicales	Interrumpe la energía del metabolismo en mitocondria. DL ₅₀ oral para mamíferos 25– 3,000, dérmica > 1,000. Más tóxico para mamíferos y más persistente que muchos insecticidas botánicos. Puede presentar toxicidad crónica. Extremadamente tóxico para peces.	En jardines y orquídeas contra muchos insectos, especialmente escarabajos. Persiste en niveles efectivos de 3 a 5 días o más. Usado como veneno para peces.
Sabadilla	Semillas de Liliis tropicales, <i>Schoenocaulon officinale</i> y <i>Veratrum album</i> europeo	Interfiere con el movimiento de iones Na ⁺ y K ⁺ en los axones nerviosos. DL ₅₀ oral para mamíferos cercana a 4,000. Irrita la piel y membranas mucosas; potente inductor de estornudos	En vegetales y frutas particularmente contra insectos plaga de calabaza, arlequín de la calabaza y trips de cítricos. Se degrada rápidamente
Ryania	Tallos leñosos de <i>Ryania speciosa</i>	Activa la apertura de canales de Ca ⁺ y causa parálisis en músculos de insectos y vertebrados. DL ₅₀ oral para mamíferos cerca de 1,000; dérmica cerca de 4,000. Más persistente que la rotenona pero menos potente	En frutos y cultivos agrícolas particularmente contra gusanos y trips. A menudo se combina con rotenona y piretrinas en mezclas comerciales para su uso en jardín
Nicotina	Tabaco, otras especies de <i>Nicotiana</i> , también <i>Duboisia</i> , <i>Anabasis</i> , <i>Asclepias</i> , <i>Equisetum</i> y <i>Lycopodium</i>	Mimetiza la acetilcolina neurotransmisora y sobreestimula las células receptoras para causar convulsiones y parálisis. DL ₅₀ oral para mamíferos de 3 a 188; dérmica 50 o menor. Los insecticidas de nicotina son muy tóxicos a humanos	Mayormente en invernaderos y jardines orgánicos. Fumigaciones con nicotina atacan áfidos, trips y ácaros. Sulfato de nicotina en soluciones no alcalinas pueden tardar de 24 a 28 h Y dar una protección residual limitada.
Neem/ azadiractinas	Hojas, semillas y corteza de Neem (<i>Azadirachta indica</i>) y Cinamomo (<i>Melia azedarach</i>)	La naturaleza bioquímica de los efectos de repelencia, disuasivos alimentarios y regulación del crecimiento no han sido bien descritos. DL ₅₀ oral para mamíferos mayor de 13,000; usada medicinalmente en humanos.	En muchos cultivos y plantas de jardín, especialmente contra plagas de cuerpo suave y sedentarias. Muy corta persistencia en plantas tratadas
Limoneno/ Linalool	Aceites de cítricos (el linalool está presente en muchas otras plantas)	Limoneno: DL ₅₀ oral para mamíferos >5,000; linalool: Dosis Letal ₅₀ oral para mamíferos > 2,400; dérmica > 3,500. Limoneno causa estimulación espontánea de nervios sensitivos; la naturaleza bioquímica del modo de acción no ha sido bien descrita	Principalmente como shampoos y sprays para matar pulgas y piojos. Sinergizado por piperonil butóxido (PBO). Muy corta persistencia en superficies tratadas

*La Dosis Letal₅₀ estimada es expresada en mg de toxina por Kg de peso del cuerpo para pruebas en animales. Dosis Letal₅₀= dosis estimada para matar 50% de la población animal probada; los números mayores indican menor toxicidad.
Fuente: (Weinzierl, 2000).

El uso de plaguicidas organosintéticos se ha convertido en el principal método de combate de plagas en los últimos 60 años; sin embargo, el empleo irracional de estos agroquímicos, (debido al incremento en la frecuencia y dosis de la aplicación, uso de mezclas, empleo de productos inefectivos y la aplicación de productos persistentes, así como el uso de equipo inadecuado, entre otros factores), ha propiciado que las plagas generen resistencia a los plaguicidas más comunes en el mercado, así como la contaminación del agua, aire y suelo, acumulación de residuos tóxicos en los alimentos causando intoxicaciones a los consumidores y usuarios (Rodríguez, 2001)

En un esfuerzo por superar estos problemas, se ha puesto gran énfasis en la investigación y desarrollo de métodos para el control de plagas, utilizando productos naturales como los metabolitos secundarios producidos por algunas especies vegetales de manera natural.

Algunos de los plaguicidas naturales más comunes provienen de las semillas, flores, hojas, tallos o raíces de las plantas. Aunque muchos venenos de origen vegetal son muy tóxicos para ciertos insectos, la mayoría no dejan residuos de larga duración por lo que no son tóxicos para el hombre y otros animales (Davidson, 1996). En su forma más simple son preparaciones crudas, en forma de polvo o talco, que pueden ser usados diluidos o sin diluir en un acarreador como arcilla, talco, etc. Algo un poco más sofisticado son los extractos acuosos o los extractos con solventes orgánicos de los componentes insecticidas de las plantas.

Los extractos y polvos vegetales pueden actuar de una o varias de las siguientes formas:

Insecticidas de contacto

Inhibición de crecimiento

Abrasivos, causan lesiones en la cutícula

Deshidratantes, afectan la viabilidad de los huevecillos

Sustancias antialimentarias

Agentes morfogenéticos

Sustancias repelentes

Sustancias atrayentes

(Guerra, 200; Lagunes, 1994)

Aunque los insecticidas botánicos comprenden una pequeña porción del volumen total de insecticidas empleados anualmente en todo el mundo, siguen siendo una alternativa para el control de insectos plaga por las siguientes razones:

- ✓ Constituyen un grupo diverso de químicos con diferentes modos de acción, algunos de los cuales son similares a los de los insecticidas sintéticos, y en ocasiones proveen un control más efectivo en plagas que son resistentes a los insecticidas sintéticos.
- ✓ La mayoría tiene una permanencia corta en el ambiente, por lo que son de bajo riesgo, para los organismos que no son plaga, y los consumidores humanos de los cultivos tratados
- ✓ Se presentan naturalmente o derivan o se elaboran con tecnología mínima, por lo que algunas veces son aceptados por programas de certificación orgánica y por ciertos grupos de consumidores, también pueden estar más disponibles que los insecticidas sintéticos

Aún cuando los insecticidas vegetales constituyen opciones muy ventajosas desde el punto de vista ecológico y de salud, es difícil pensar que van a reemplazar completamente a los insecticidas organosintéticos, sin embargo el uso de insecticidas botánicos se han perfilado como una alternativa real para complementar los programas de Manejo Integrado de Plagas en la agricultura: tradicional y comercial. En la primera como una opción económica de fitoprotección. En la segunda, como fuente de nuevas sustancias que permitan manejar la resistencia de las plagas a los insecticidas organosintéticos. En contraparte la agricultura orgánica es un mercado muy demandante de insecticidas vegetales debido al compromiso de no utilizar agroquímicos convencionales. Este mercado actualmente se encuentra en expansión y por lo general tiene altas tasas de retorno, por lo tanto, constituye un nicho importante por atender. La demanda de productos naturales ha crecido en los últimos 20 años alentando a realizar investigaciones para conocer el verdadero potencial de cada especie vegetal (Rodríguez, 2001).

El principal mercado de los insecticidas vegetales hoy en día es el de parques, jardines y algunos invernaderos. Se espera que en 10 a 15 años, estos compuestos aumenten en un 25% su participación en el mercado de insecticidas y no solamente se limiten al área de jardinería sino que se expandan masivamente en ámbitos como el agrícola y el urbano

Por siglos la humanidad ha dependido de las plantas como fuente de carbohidratos, proteínas y grasas para comida. Adicionalmente las plantas son una valiosa fuente de productos naturales empleados como materia prima en la industria. Alrededor del ochenta por ciento de los aproximadamente 30,000 productos naturales conocidos son de origen vegetal (Ramachandra y Ravishankar, 2002)

En años recientes ha habido un renovado interés en los productos naturales y aquellos que se elaboran o diseñan a partir de compuestos vegetales. Dichos compuestos se obtienen a partir de partes o extractos de plantas que en su mayoría son colectadas de su hábitat natural, ocasionando pérdida de diversidad genética y destrucción del hábitat e incluso ha llevado a muchas plantas al peligro de extinción. Se calcula que, aproximadamente dos tercios de las 50,000 diferentes especies de plantas con actividad biológica empleadas actualmente, se colectan del campo (Canter *et al.*, 2005; Rout *et al.*, 2000).

La biotecnología nos ofrece, a través del cultivo de tejidos vegetales (CTV), una alternativa para establecer cultivos controlados y eficientes de un gran número de especies vegetales para obtener plantas completas o producir metabolitos secundarios de interés para el ser humano.

1.16 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha proporcionado. Comprende un heterogéneo grupo de técnicas que consisten, esencialmente en aislar una porción de la planta, conocida como explante (por ejemplo, protoplasto, célula, tejido, órgano) y proporcionarle de forma artificial las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido, para lo cual es necesario mantener los cultivos en condiciones de asepsia (Roca y Mroginski, 1991).

Las aplicaciones del CTV van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la micropropagación, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Thorpe, 1990; Jiménez, 1998).

Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902, con los intentos realizados por Haberlandt al cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencialidad celular, el cual es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998). La capacidad de cualquier célula vegetal para dividirse, crecer y desarrollarse como un organismo multicelular, hasta constituir una planta completa, es lo que se denomina como totipotencialidad celular (Razdan, 2002).

Estos primeros intentos fracasaron debido a que los medios de cultivo que se empleaban no incluían reguladores de crecimiento, aún desconocidos en ese entonces.

En 1934, White pudo mantener en forma ilimitada el crecimiento de raíces en medios líquidos a partir de ápices de jitomate. Al mismo tiempo se identificó el ácido indolacético (AIA), que abrió grandes posibilidades para el cultivo de tejidos *in vitro* (Litz y Jarret, 1991).

Diferentes autores concuerdan en que el crecimiento y morfogénesis *in vitro* de los tejidos está determinado por una serie de factores complejos (George y Sherrington, 1984; Pérez *et al*, 1999; Pierik, 1990):

Selección de la planta donadora

Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas y /o fitoquímicas especiales que se desean reproducir. También se debe de tomar en cuenta el estado fisiológico de la planta pues es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencia en los requerimientos hormonales y nutricionales cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas.

Selección del explante

El explante es el órgano o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, tallo, cotiledón o raíz, entre otros. En teoría, cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tipo de explante que se elija será determinante en la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá de manera diferente al cultivo. Por regla general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido mejor será la respuesta al cultivo *in vitro* (Jiménez, 1998).

Medio de cultivo

El medio de cultivo junto con el tipo de explante determinan la respuesta que se obtendrá del mismo. George y Sherrington (1984) mencionan que, un medio es una solución que contiene sales que suplen en mayor o menos grado los elementos básicos necesarios para el desarrollo de las plantas; como son los micronutrientes y macronutrientes, vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono.

Los medios de cultivo pueden utilizarse en forma líquida o semisólida con la adición de algún gelificante como el agar, del cual se aprovecha la consistencia coloide para servir de soporte y proveer de nutrientes a la planta.

pH del medio

Aun cuando se han hecho pocos estudios del efecto del pH óptimo para diferentes especies, generalmente la acidez de los medios de cultivo se ajusta entre 5 y 6.5 antes de la esterilización. El rango de acidez influye en la solidificación del medio y en la disponibilidad de nutrientes ya que es conocido que algunos elementos suelen precipitarse o no estar disponibles en la planta a cierto pH (Hernández, 1996).

Factores físicos

Los factores físicos ambientales como fotoperiodo, temperatura y humedad tienen tanta importancia en el crecimiento y desarrollo *in vivo* como *in vitro*. Estos factores influyen prácticamente en todo tipo de procesos: absorción de agua y nutrientes, evaporación, fotosíntesis, síntesis de almidón, respiración, crecimiento y morfogénesis, entre otros (Pierick, 1990).

Reguladores de crecimiento

El desarrollo de las plantas es un proceso dinámico, complejo y está rigurosamente controlado, entre otras cosas, por sustancias conocidas como fitohormonas que juegan un papel principal como control, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross 1994).

Una hormona es un compuesto orgánico que se sintetiza en ciertos lugares de la planta y que se mueve a otros sitios, en donde a concentraciones muy bajas modifican, estimulan o inhiben el crecimiento o los patrones de desarrollo de la planta.

Los productos químicos sintetizados con actividades fisiológicas similares a las hormonas vegetales, o los compuestos que tienen una capacidad de modificar el crecimiento vegetal por algunos otros medios, se llaman reguladores del crecimiento vegetal (Pierik, 1990).

Actualmente se reconocen 9 tipos básicos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal: las auxinas, citocininas, giberelinas (GA), el ácido abscísico (ABA), el etileno y los brasinosteroides, ácido salicílico, jasmonato y sisteina (Raven *et al.*, 1999).

En el cultivo *in vitro* los reguladores de crecimiento más utilizados son las auxinas y citocininas.

Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos ampliamente empleados en la micropropagación, derivados comúnmente del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas (sitios de crecimiento activo). El transporte basipetalo de las auxinas les confiere funciones biológicas específicas en procesos tales como la dominancia apical, la comunicación entre raíz y tallo, la diferenciación del tejido vascular y la elongación celular, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas (Leyser, 1997; Macdonald, 1997; Pérez *et al.*, 1999).

Cuando las auxinas son incorporadas al medio de cultivo, promueven el crecimiento de callo, así como el crecimiento y elongación celular, la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces), sin embargo inhiben el crecimiento de las yemas axilares y la formación de brotes adventicios. (George y Sherrington, 1984).

Citocininas

Las citocininas generalmente son derivados de la adenina, y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Los embriones y frutos jóvenes, presentan concentraciones altas de citocininas, sin embargo, éstas necesitan ser aisladas a partir de raíces, hojas y flores, entre otras (Arditti, 1992). En el cultivo *in vitro* estimulan la división celular, disminuyen la dominancia apical rompiendo la latencia de las yemas axilares y promueven la formación de brotes adventicios pero inhiben la formación de raíces. En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia (Pérez *et al.*, 1999).

El balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro*, suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido (Pérez *et al.*, 1999), por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación (Pérez, 1998).

1.17 Micropropagación

La micropropagación es una tecnología que se ha desarrollado en los últimos treinta años, y se refiere a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* (Debergh y Zimmerman, 1991). Las principales ventajas de este sistema de propagación se resumen en: 1) obtención de altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular cantidades elevadas de plantas en cortos periodos de tiempo, 2) es un sistema de propagación clonal, por lo que es ideal para la propagación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes, 3) la producción de plantas es independiente de las condiciones ambientales, 4) se obtiene uniformidad en las plantas producidas y 5) mayor facilidad en la comercialización (Jiménez, 1998).

De acuerdo con Debergh y Zimmerman (1991), la micropropagación comprende las siguientes etapas: Etapa 0: Etapa preparativa. Esta etapa consiste en la selección y preparación de la planta madre, la cual debe de ser típica de la variedad y estar libre de enfermedades. Etapa 1: Iniciación del cultivo. Consiste en el establecimiento de un cultivo axénico a partir de la planta madre. Etapa 2: Multiplicación. El objetivo de esta etapa es lograr la multiplicación de órganos y estructuras que son capaces de dar lugar a la formación de nuevas plantas. Es la fase más importante y determinante en todo el programa de propagación *in vitro*.

Etapa 3: Elongación y desarrollo de brotes y formación de raíces. El objetivo es lograr el desarrollo de los brotes formados en la etapa 2 y el enraizamiento de los mismos antes de ser transferidos a condiciones *ex vitro*. Etapa 4: Aclimatización. Consiste en el establecimiento *ex vitro* de las plantas micropropagadas.

De acuerdo con George & Sherrington (1984), existen dos vías diferentes para lograr la regeneración de plantas *in vitro*: 1) la organogénesis y la embriogénesis somática. Éstas pueden ocurrir de manera directa a partir del explante inicial o bien de forma indirecta mediante la formación de callo y su posterior diferenciación.

1.17.1 Micropropagación vía organogénesis

La organogénesis en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se refiere a la formación de novo de órganos a partir de los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar se encuentran las raíces, tallos o los llamados brotes adventicios, que son estructuras similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces. En la organogénesis, los brotes y raíces formados tienen un origen multicelular, además se trata de estructuras monopolares, que posteriormente desarrollan tejido procambial, el cual establecerá una conexión con el tejido vascular del explante cultivado (Terzi y Loschiavo, 1990).

Este fenómeno se basa en la totipotencialidad celular, es decir, cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primero se origina tejido calloso y luego se originan los órganos a partir de éste. Entre los factores que contribuyen a la inducción de los brotes adventicios destacan los reguladores de crecimiento, en particular, las auxinas y citocininas (Pérez *et al.*, 1999).

1.17.2 Micropropagación vía embriogénesis somática

La embriogénesis somática es una vía en la que las células somáticas o gaméticas presentes en los tejidos vegetales, forman un embrión sin la necesidad de la fusión de gametos, mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica (Thorpe y Stasolla, 2001). Los embriones somáticos se caracterizan por ser estructuras bipolares, con un eje radical-apical y que no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de formar plantas completas (Gómez, 1998).

Entre los principales factores que afectan la inducción de la embriogénesis somática se encuentran: el genotipo del material inicial, el origen del explante y la composición del medio de cultivo, particularmente con respecto a las hormonas presentes (Terzi y Loschiavo, 1990). Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa y la indirecta. En la embriogénesis somática directa, los embriones aparecen directamente sobre el explante original, mientras que en la embriogénesis somática indirecta, primero se genera un tejido calloso a partir del cual se obtendrá la diferenciación de los embriones somáticos en un segundo paso.

En la **Tabla 4**, se presentan algunas plantas de diferentes familias que poseen actividad biológica de interés para el ser humano y que se han propagado utilizando el cultivo de tejidos vegetales

Tabla 4. Algunas plantas que presentan actividad biológica propagadas por cultivo de tejidos vegetales

ESPECIE	FAMILIA	EXPLANTE	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>Atropa baetica</i>	Solanaceae	Yemas axilares	Formación de brotes	Zárate <i>et al.</i> , 1997.
<i>Atropa belladonna</i>	Solanaceae	Yemas axilares	Formación de brotes	Benjamín <i>et al.</i> , 1987. Heble <i>et al.</i> , 1983.
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Ápice de brote, nudos	Formación de brotes	Furmanowa <i>et al.</i> , 1986.
<i>Ceropegia candelabrum</i>	Asclepiaceae	Hojas	Embriogénesis somática	Beena, M. R. y Martin, K. P. 2003.
<i>Piper longum</i>	Piperaceae	Ápice de brote	Formación de brotes	Soniya y Das, 2002.
<i>Piquería trinervia</i>	Asteraceae	Nudos	Formación de brotes	Hernández, 1996.
<i>Tagetes erecta</i>	Asteraceae	Hoja	Formación de brotes	Vanegas <i>et al.</i> , 2002.

1.18 El cultivo de tejidos vegetales como fuente de metabolitos secundarios

Las plantas producen más de 80,000 diferentes compuestos conocidos como metabolitos secundarios a través de sus rutas secundarias. Aunque en un principio se creyó que eran compuestos de desecho ahora se sabe que tienen un papel importante en la sobrevivencia y adaptación de la planta. Son particularmente importantes para las interacciones de la planta con su ambiente, funcionan como defensas o protección ante el ataque de enemigos naturales incluyendo herbívoros, insectos, patógenos (hongos, bacterias), y competidores. También sirven como atrayentes de los polinizadores y los dispersores de semillas y tienen diversas funciones fisiológicas como el almacenamiento y transporte de nitrógeno tóxico (alcaloides y péptidos), protección contra los rayos UV e infecciones (flavonoides) o herbivoría (alcaloides), entre otras (Canter, 2005)

El hombre ha utilizado los metabolitos secundarios para la producción de medicamentos, aditivos alimenticios, saborizantes, pigmentos, colorantes, cosméticos, perfumes, insecticidas, resinas, saponinas, aceites volátiles, entre muchos otros. Por otra parte, la biosíntesis de estos compuestos frecuentemente permite relacionar grupos taxonómicos a nivel división, subdivisión, clase, subclase, grupo, familia, género y especie, o grupos de familias cercanamente relacionadas (Gottlieb, 1990).

En términos de economía celular, es caro producir y acumular metabolitos secundarios, pues se presentan en menores cantidades que los metabolitos primarios. Aunado a esto está el hecho de que las plantas tienen la facultad de sintetizar los metabolitos secundarios en células especializadas y almacenarlos en vacuolas y en distintos estados de desarrollo, ocasionando que su extracción, aislamiento y purificación sean difíciles de lograr (Bakandrin y Klocke, 1988 citados por Hernández, 1998). En términos comerciales también resulta caro producir metabolitos secundarios, pues la mayoría se extraen de plantas cultivadas o silvestres y se requieren grandes volúmenes de material. A pesar de los costos que pueda tener la producción de metabolitos por cultivo de tejidos, sigue siendo una opción para la producción de compuestos cuya síntesis química resulta imposible debido a la alta complejidad de las moléculas (Hernández, 1998). Las tecnologías de cultivo de tejidos vegetales nos dan la posibilidad de estudiar y producir metabolitos secundarios con cierto nivel de calidad y de forma constante a través de diferentes sistemas *in vitro* como los cultivos de células en suspensión, cultivo de callo y los cultivos de raíces, órganos, embriones y plantas (**Tabla 5**) (Bourgaud *et al.*, 2001). Adicionalmente hoy podemos hablar de la biotransformación, raíces transformadas y modificación genética como métodos para mejorar la producción de metabolitos secundarios a través del CTV.

Tabla 5. Metabolitos secundarios bioactivos producidos por cultivo de tejidos

ESPECIE	COMPUESTO ACTIVO	TIPO DE CULTIVO	REFERENCIA
<i>Agave amaniensis</i>	Saponinas	Callo	Andrijany <i>et al.</i> , 1999.
<i>Ammi majus</i>	Umbelliferona	Raíces transformadas	Królicka <i>et al.</i> , 2001.
<i>Ipomoea Cairica</i>	Lignina	Callo	Páska <i>et al.</i> , 1999.
<i>Catharanthus roseus</i>	Catarantina Ajmalicina	Raíces	Vázquez-Flota <i>et al.</i> , 1994.
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Piretrinas	Callo	Rajasekaran <i>et al.</i> , 1991.
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Ácido crisantémico y piretrinas	Células en suspensión	Kueh <i>et al.</i> , 1985.
<i>Duboisia myoporoides</i>	Escopolamina	Raíces	Yukimune <i>et al.</i> , 1994.
<i>Ipomoea cairica</i>	Lignans	Callo	Páska C. <i>et al.</i> , 1999
<i>Piqueria trinervia</i>	Piquerol A	Células en suspensión	Saad I. <i>et al.</i> , 2000
<i>Taxus spp.</i>	Taxol	Células en suspensión	Wu <i>et al.</i> , 2001.
<i>Stizolobium hasjoo</i>	L-DOPA	Células en suspensión	Huang <i>et al.</i> , 2002.

2. JUSTIFICACIÓN

Hay pocas actividades humanas con un impacto tan fuerte sobre el equilibrio ecológico como la agricultura. El empleo de fertilizantes y plaguicidas con fines de incrementar la producción agrícola, ha llevado a una cadena de problemas de gran magnitud como la contaminación de los productos cosechados y del medio ambiente incluyendo suelo, agua y aire. Por otro lado se han desarrollado plagas cada vez más resistentes el maíz, generando la necesidad de aplicar dosis mayores o utilizar químicos más fuertes.

Actualmente gran parte de los metabolitos secundarios empleados en la industria son extraídos de plantas, principalmente de aquellas que crecen de forma silvestre en el campo. Sin embargo, este material no siempre es de calidad por lo que algunas veces el contenido de metabolitos secundarios es muy bajo o varía de una planta a otra en una misma región. Adicionalmente se requieren grandes cantidades de material crudo por lo que no se puede asegurar un suministro constante, e incluso, la sobrecolecta ha llevado a diversas especies al peligro de extinción.

Se han identificado en *Ipomoea carnea* compuestos con actividad biológica de gran importancia como son la insecticida y terapéutica. La actividad insecticida se puede evaluar en cultivos de gran importancia para México como es el caso del maíz.

La micropropagación por cultivo de tejidos vegetales de *Ipomoea carnea* propone un nuevo sistema que puede ser explorado en diferentes vías. Primero, permite obtener un elevado número de plantas de calidad genética y fitosanitaria en poco tiempo, Segundo, se puede generar un sistema de cultivo de callo del cual se puede obtener la producción de metabolitos secundarios sin necesidad de tener la planta completa, El cultivo de callo nos permitiría obtener los compuestos de interés en mayores cantidades, en tiempos más cortos y de manera constante. Esto también puede lograrse con el cultivo de células en suspensión y cultivo de órganos. La técnica permite el conocimiento, uso y conservación de plantas mexicanas con potencial biotecnológico, contribuyendo a la búsqueda de nuevos insecticidas naturales y moléculas con potencial terapéutico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Inducir la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea* y evaluar el potencial bioinsecticida de extractos orgánicos de callos contra *Spodoptera frugiperda*.

3.2 Objetivos particulares

- ✓ Determinar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de *Ipomoea carnea*.
- ✓ Determinar el tipo de explante y concentración de reguladores de crecimiento, adecuados para la inducción de brotación múltiple.
- ✓ Establecer el medio más adecuado para el enraizamiento de los brotes de *Ipomoea carnea*.
- ✓ Llevar a cabo la aclimatización de las plántulas generadas *in vitro* y evaluar su adaptación en condiciones *ex vitro*.
- ✓ Evaluar la actividad biológica insecticida de extractos orgánicos hexánicos clorofórmicos y metanólicos de los callos derivados de *I. carnea* en *Spodoptera frugiperda*.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Las semillas de *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae) que se utilizaron en este trabajo fueron donadas por el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

4.2 Desinfección de las semillas de *Ipomoea carnea*

Para desinfectar las semillas se eliminaron los tricomas que cubren las testa de las mismas ya que éstos son una fuente de contaminación, una vez que las semillas quedaron limpias se procedió a probar tres métodos de desinfección.

A.- Las semillas se lavaron en una solución jabonosa durante 20 min, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en etanol al 70 % durante 5 min y en alcohol al 96% durante 7 min, después se sumergieron en una serie gradual de soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% durante 5 min, al 15% durante 7 min y al 25% durante 5 min. Finalmente, dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en frascos gerber.

B:-Las semillas se lavaron en una solución jabonosa durante 20 min, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en etanol al 70 % durante 5 min y en alcohol al 96% durante 7 min. Posteriormente se pasaron directamente a una solución de cuprimicín (fungicida) 300 mg en 100 ml de agua destilada durante 10 min. Transcurrido el tiempo las semillas se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en una serie gradual de soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% durante 5 min, al 15% durante 7 min, y al 25% durante 5 min. Finalmente, dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en frascos gerber

C.- Las semillas se lavaron en una solución jabonosa durante 20 min, se enjuagaron con agua corriente y ya dentro de la campana de flujo laminar se sumergieron en una solución de PPM (Plant Preservative Mixture) al 2% durante 2 h; trascurridas las dos horas, las semillas se sembraron directamente en los frascos gerber.

Los frascos gerber contenían 25 ml de medio MS (1962) al 50% de sales con dos semillas cada uno. Se realizaron 5 repeticiones por cada método de desinfección.

Los lavados y enjuagues se realizaron en agitación suave y constante.

El porcentaje de contaminación se evaluó al segundo, quinto y décimo día de siembra.

4.3 Germinación

En la germinación de las semillas se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), al 50% de sales, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de phytigel. El pH del medio se ajustó a 5.7 con HCl y KOH 0.5 N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C (1.5 kg/ cm²).

Todos los tratamientos se mantuvieron en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C.

Para evaluar la respuesta de germinación se realizaron 4 experimentos en los que se evaluaron dos variables, el efecto de la escarificación mecánica (lijar la testa) y el efecto de la luz.

1. Semillas escarificadas mecánicamente (se raspó con una lija) y fotoperiodo.
2. Semillas no escarificadas y fotoperiodo.
3. Fotoperiodo largo (16 h Luz/ 8 h oscuridad).
4. Oscuridad.

Para la evaluación del efecto de la escarificación mecánica en la germinación, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

En los experimentos 3 y 4. Se realizaron 14 repeticiones por tratamiento se colocaron 3 semillas por repetición. La respuesta de germinación de las semillas se evaluó al tercer día de siembra. Se consideraron germinadas aquellas semillas que presentaban la radícula emergida hacia el medio.

4.4 Inducción de brotación múltiple

El material vegetal que se utilizó para inducir la brotación múltiple se obtuvo de pántulas de 13 días de edad, germinadas *in vitro* en medio MS al 50 % de sales en condiciones de fotoperiodo largo y a 25 ± 2 °C.

En esta etapa se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), al 100% de sales, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de phytigel. El pH del medio se ajustó a 5.7 con HCl y KOH 0.5 N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C (1.5 kg/ cm^2). Todos los frascos que se usaron para sembrar contenían 25 ml de medio y se mantuvieron en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad.

Para determinar la combinación y concentración de BAP y AIA más adecuadas par la inducción de brotación múltiple, se diseñaron dos experimentos

1. Un experimento preliminar en el que se combinaron: la citocinina (BAP) en concentraciones de 0, 1, 2 y 3 mg/l y la auxina (AIA) en concentraciones de 0, 0.5 y 1 mg/l, (**Tabla 6.**).

Se utilizaron como explantes:

- a) Cotiledones completos
- b) Nudo cotiledonar de 1 a 2 cm de longitud

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento con dos explantes por repetición. La evaluación por conteo de brotes para cada uno de los explantes se hizo a los 28 y 63 días de tratamiento.

Tabla 6. Tratamientos hormonales para inducción de brotes a partir de cotiledones y nudos en medio MS adicionado con BAP y AIA, pH 5.7, 30 g/l de sacarosa, 5 g/l phytigel, 25 ± 2 °C, 16 h luz / 8 h oscuridad

AUX \ CIT		BAP mg/l			
		0.0	1.0	2.0	3.0
AIA mg/l	0.0	1	2	3	4
	0.5	5	6	7	8
	1.0	9	10	11	12

2. Con base en la mejor respuesta del tratamiento anterior se realizó un segundo experimento en el que se combinaron; la citocinina (BAP) en concentraciones de 1, 2.5 y 4 mg/l y la auxina (AIA) en concentraciones de 0 y 1 mg/l, (Tabla 7), para evaluar las posibles variaciones en brotación con respecto a las concentraciones hormonales. En este caso se probó una concentración más elevada de BAP 4 mg/l para probar si aumentaba el número de brotes generados.

Debido a que en el experimento preliminar no se obtuvo brotación con los cotiledones en este segundo experimento se emplearon como explantes:

- a) Nudo cotiledonar de 1 a 2 cm de longitud
- b) Ápice de 0.5 a 1 cm de longitud

Para este experimento se realizaron y 3 repeticiones por tratamiento y tipo de explante con dos explantes por repetición.

A fin de realizar un registro más detallado y observar los cambios morfológicos de los explantes; la evaluación por conteo de brotes para cada uno de los explantes se inició a los 14 días de tratamiento y posteriormente se realizó a los 24 y 34 días. Durante este periodo se presentó la formación de callo en la base de los explantes, el cual ocasionó la muerte o debilitamiento de algunos brotes. El callo se cortó y los explantes se subcultivar en medio MS sin reguladores de crecimiento para que los brotes que no habían sido afectados siguieran diferenciándose. Los brotes sin callo permanecieron 30 días en las condiciones de iluminación y temperatura antes mencionadas. La evaluación por conteo de brotes se realizó a los 10 y 20 días de haber sido aislados del callo.

Tabla 7. Tratamientos hormonales para inducción de brotes a partir de ápice y nudos en medio MS adicionado con BAP y AIA, pH 5.7, 30 g/L de sacarosa, 5 g/L phytigel, 25 \pm 2 °C, 16 h luz / 8 h oscuridad

		CIT		BAP mg/L		
		1.0	2.5	4.0		
AIA mg/L	0.0	1	2	3		
	1.0	4	5	6		

4.5 Enraizamiento

Una vez concluida la etapa de inducción (después de 60 días de cultivo) los brotes que medían en promedio 1.0 a 3.0 cm de longitud, se individualizaron y sembraron en medio MS al 50% de sales sin reguladores de crecimiento, 30 g/l de sacarosa y 5 g/l de phytigel.

Se colocaron 2 brotes por frasco y se mantuvieron durante 30 días en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad.

La evaluación de la respuesta por número de raíces generadas se realizó al quinto y décimo día posteriores a la individualización y trasplante al medio de enraizamiento.

4.6 Aclimatización

Una vez que las plantas de *Ipomoea carnea* generadas *in vitro* habían alcanzado una altura de 5 a 7 cm y que poseían como mínimo 3 raíces bien desarrolladas, se consideraron listas para la aclimatización. Las plantas se sacaron de los frascos y se lavaron cuidadosamente con agua corriente para quitar completamente cualquier resto de agar y se plantaron en 4 charolas de plástico que contenían una mezcla de tierra de hoja, sphagnum y agrolita en una proporción 1:1:1 previamente humedecida y esterilizada en el horno de microondas durante 30 min.

Para mantener la humedad relativa alta, las charolas se cubrieron de plástico y se colocaron en un cuarto para aclimatización con luz natural, después de dos semanas, se empezó a perforar las cubiertas para reducir de manera gradual la humedad relativa. La sobrevivencia de las plántulas se cuantificó por la generación de nuevas hojas y elongación del tallo.

4.7 Cultivo de callo

Durante la fase de inducción de brotación múltiple, en algunos tratamientos se generó callo. El tratamiento en el que hubo mayor formación de callo y con mejor apariencia fue el que tenía 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA. Con base en estos resultados se procedió a separar el callo que se había formado en diferentes tratamientos y se colocó durante 30 días en medio MS líquido al 100% de sales con las concentraciones hormonales antes mencionadas, a fin de inducir el crecimiento y disgregación del mismo; para lo cual se utilizaron matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml con 50 ml de medio y se mantuvieron en una mesa de

agitación a 100 rpm en una cámara de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad. Después de permanecer 30 días en medio líquido, el callo no presentó cambios significativos en volumen ni consistencia, el callo seguía teniendo consistencia compacta. A fin de inducir el crecimiento del callo, éste se subcultivó en frascos gerber con 25 ml de medio MS sólido al 100% de sales adicionado con 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA. Cada frasco contenía tres cúmulos de callo y se mantuvieron durante 30 días en una cámara de incubación en las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas.

4.8 Obtención de extractos

Para la preparación de extractos vegetales se usaron 80.082 g del callo que estaba en medio sólido y se molieron en fresco en un mortero de cerámica.

El callo macerado se colocó de manera secuencial en hexano, cloroformo y metanol y se dejó en reposo durante 72 h cada uno en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Los extractos obtenidos se filtraron y posteriormente se concentraron con ayuda de un rotavapor.

4.9 Bioensayo de toxicidad con *Spodoptera frugiperda*

Para realizar los bioensayos se utilizaron placas de poliestireno (Cell Wells, Corning con 24 pozos de 20 mm de diámetro, No. 25820) cuyos pozos se llenaron con 2 ml de dieta merídica (**Apéndice 7.2**). La dieta se dejó solidificar a temperatura ambiente, una vez solidificada, sobre la superficie se depositó y extendió una capa del extracto correspondiente de *Ipomoea carnea* en una concentración de 200 µg por cm² de superficie en el caso de los extractos de cloroformo y metanol, para el extracto de hexano la concentración fue de 400 µg por cm² de superficie. Los controles consistieron en una placa a la que sólo se le agregó el solvente. Una vez que el extracto se secó, se depositó una larva de primer estadio por cada pozo. Finalmente, cada placa se cubrió con plástico autoadherible (Saran Wrap) para evitar que las larvas se escaparan de sus pozos. Con ayuda de un alfiler, se hizo en cada pozo un orificio sobre el plástico (para respiración). Las placas con las larvas se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura $27^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de luz- oscuridad de 16/8 h durante siete días. Después de este tiempo las placas se revisaron y se contaron las larvas muertas y vivas. Se realizaron dos repeticiones por extracto donde una placa se consideró como una repetición

4.10 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la escarificación en la germinación de las semillas, el número de brotes formados por explante, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se aplicó una prueba de Duncan para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Para evaluar los resultados obtenidos en los bioensayos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se aplicó una prueba de Tukey y Kramer para determinar las diferencias de medias estadísticamente significativas entre tratamientos.

El análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.0.

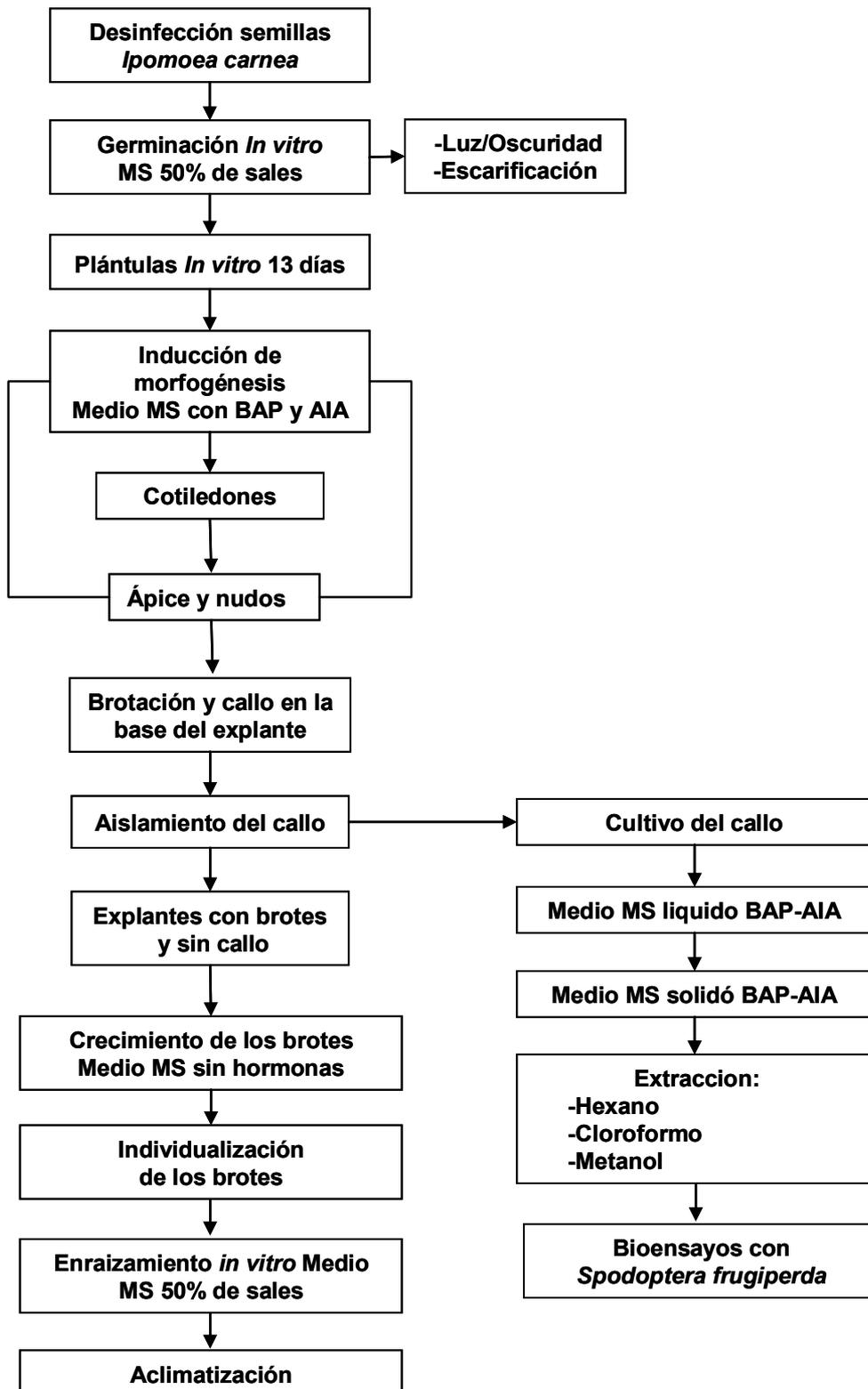


Figura 7. Diagrama operativo para la regeneración *in vitro* de *Ipomoea carnea*

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desinfección de las semillas de *Ipomoea carnea*

Uno de los principales problemas que se enfrentan en el cultivo *in vitro*, es la obtención de cultivos asépticos. Las bacterias, las levaduras y los hongos son los organismos contaminantes más frecuentes que se observan en los cultivos. Estos organismos se encuentran en todas las plantas y semillas, principalmente en aquellas que se colectan del campo y suelen ser causantes de cuantiosas pérdidas de material vegetal en laboratorios comerciales y de investigación. Los contaminantes al entrar en contacto con el medio de cultivo, encuentran condiciones propicias para su desarrollo y empiezan a competir con los tejidos vegetales por los nutrientes del medio, además les provocan daños directos e indirectos al colonizar sus tejidos o al secretar metabolitos tóxicos en el medio de cultivo, ocasionando la disminución o inhibición de la germinación, multiplicación o enraizamiento y con frecuencia la muerte de la planta o tejidos. Por lo tanto, la adecuada desinfección de nuestro material vegetal siempre es necesaria (Alvarado, 1998).

En las técnicas de cultivo *in vitro* algunos de los compuestos químicos más utilizados para la desinfección superficial de los explantes o semillas son el alcohol etílico y el cloro comercial o hipoclorito de sodio (NaOCl). El hipoclorito de sodio posee actividad bactericida de amplio espectro, en bajas concentraciones no es tóxico para el ser humano, no deja residuos venenosos, y es incoloro. Es un agente oxidante que al disolverse en agua produce un ion ClO⁻ que destruye a las bacterias por oxidación de compuestos vitales para ellas, principalmente proteínas (Block, 1977; Chang, 1999; Finch, 1958). Por su parte los alcoholes tienen una acción bactericida, se evaporan rápidamente y son incoloros. Actúan desnaturalizando las proteínas e inhibiendo algunas enzimas necesarias para que los microorganismos vivan (Sykes, 1958). En el caso de los tejidos vegetales ayudan a disolver las ceras que se depositan en la cutícula.

En caso de problemas severos de contaminación se sugiere el uso de antibióticos y/o fungicidas. Para que la desinfección resulte exitosa es importante tomar en cuenta varios factores. Los desinfectantes deben tener buen contacto con toda la superficie del tejido o la semilla, por lo que es recomendable que a los tejidos o semillas que se vayan a utilizar, se les quiten los tricomas, ceras, testa o cualquier otra estructura que pueda interferir en el proceso de desinfección (George y Sherrington, 1984). También se debe considerar que la penetración del desinfectante se mejora considerablemente por la inmersión del material vegetal en alcohol al 70%, por la adición de un surfactante, por la reducción de la presión del aire en el contenedor y por la agitación constante de la solución desinfectante (George,

1984). En este sentido es importante tomar en cuenta el solvente que se usa con los desinfectantes, pues éstos pueden entrar más fácilmente a las células si se encuentran en la fase acuosa natural de los microorganismos. Por lo tanto los desinfectantes son más activos en una solución acuosa (Sykes, 1958). Block (1977) menciona que en la ausencia de agua las proteínas no son desnaturalizadas tan rápidamente como cuando hay presencia de agua. Esto explica por qué el alcohol etílico absoluto, un agente deshidratante, es menos bactericida que las mezclas de alcohol y agua. Por último la duración de la desinfección no debe ser demasiado larga pues los tejidos vegetales o el embrión de las semillas se pueden dañar, pero si la exposición es muy corta los microorganismos no morirán.

Considerando las diferentes estrategias para tener material desinfectado y así evitar la pérdida de material por contaminación, a las semillas de *Ipomoea carnea* se les quitaron los tricomas que cubrían la testa (**Fig. 8 a y b**). Se aplicaron tres tratamientos de desinfección en los que se probaron el alcohol y el cloro comercial solos y en combinación con un compuesto con actividad fungicida y bactericida.

El alcohol se aplicó en una concentración del 70% y 96% durante 5 y 7 min y el cloro al 10%, 15% y 25% durante 5, 7 y 5 minutos respectivamente.

También se realizó una prueba con un nuevo agente biocida conocido con el nombre de Plant Preservative Mixture (PPM) (**Tabla 8**).

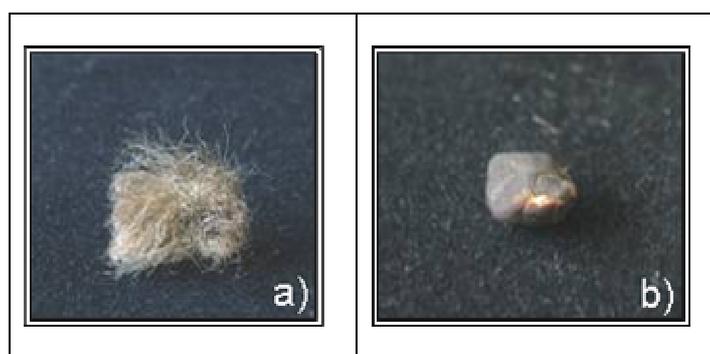


Figura 8. a) Semilla de *Ipomoea carnea* con tricomas b) Semilla de *I. carnea* sin tricomas

Tabla 8. Métodos de desinfección aplicados a las semillas de *Ipomoea carnea*

Método de desinfección	% de contaminación
A. -Sol jabonosa, alcohol 70%, 5 min y 96%, 7min, NaOCL 10 % 5min, 15% 7 min y 25% 5 min.	10.7 %
B. - Sol jabonosa, alcohol 70%, 5min y 96%, 7 min, cuprimicín 10 min, NaOCL 10%, 5min, 15%, 7 min y 25% 5 min.	0 %
C. - PPM 2 hrs.	100%

En la mayoría de los casos el uso de alcohol e hipoclorito de sodio es suficiente para una desinfección efectiva, sin embargo, los resultados que se presentan en el cuadro nos indican que el 10.7 % de las semillas a las que se les aplicó el tratamiento A presentaron contaminación por hongos y bacterias.

El tratamiento B donde se combina el alcohol, el cloro y el Cuprimicín 500 un fungicida - bactericida agrícola no fitotóxico, cuyos ingredientes activos son estreptomicina, oxitetraclina y cobre, resultó eficiente pues todas las semillas resultaron libres de contaminación.

En la lucha por prevenir o eliminar la contaminación microbiana se han desarrollado nuevos desinfectantes, como ejemplo encontramos la sustancia llamada Plant Preservative Mixture (PPM) es una solución ácida (pH 3.8) con actividad biocida de amplio espectro que mata células de hongos y bacterias, previene la germinación de esporas y en concentraciones elevadas puede eliminar la contaminación endógena además de que no afecta la germinación o regeneración.

A pesar de que se han reportado buenos resultados con el PPM, en nuestro caso el porcentaje de contaminación obtenido al aplicar sólo PPM fue del 100%. Esto pudo deberse a que las semillas requerían un mayor tiempo de exposición y a que esta sustancia es menos efectiva cuando se expone a una alta densidad de bacterias o esporas de hongos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que el tratamiento B fue el mejor para la desinfección de las semillas. A partir de estos resultados las semillas utilizadas en los siguientes experimentos se desinfectaron con el tratamiento B.

5.2 Germinación

Las semillas son un explante conveniente a emplear para iniciar un cultivo experimental *in vitro*, a partir de su germinación se logra la obtención de plántulas libres de patógenos (George & Sherrington, 1984). Por estas razones el material vegetal empleado para la inducción de brotación múltiple fueron cotiledones, nudos y ápices provenientes de plántulas de *I. carnea* germinadas *in vitro*.

Bewley y Black (1994) consideran que la germinación comprende varios eventos que comienzan con la imbibición y terminan con el inicio de la elongación del eje embrionario. El signo visible de que la germinación ha terminado, es usualmente la emergencia de la radícula a través de las estructuras que rodean al embrión. No hay una regla general que nos indique qué parte del embrión es la primera en romper la testa de la semilla. En muchos casos es la radícula y por tanto, la germinación frecuentemente es asociada con la emergencia de la raíz (Mayer y Poljakoff, 1982). Por su parte Rojas y Ramírez (1993) consideran que el proceso de germinación se inicia cuando el embrión empieza a sintetizar giberelina, lo cual no es aparente al ojo, y termina al llegar la radícula al tamaño de 0.5 cm, que es cuando por convención general se considera que la semilla ha germinado.

Con base en los criterios propuestos por éstos autores, se consideraron germinadas las semillas de *Ipomoea carnea* que presentaban la radícula emergida (**Fig. 9 a**).

Hartman y Kesler (1994) señalan que, para que la semilla pueda germinar se requieren tres condiciones:

1. La semilla debe ser viable; es decir, el embrión debe estar vivo y ser capaz de germinar.
2. La semilla no debe estar en letargo ni el embrión quiescente. No deben existir barreras fisiológicas o físicas que induzcan letargo ni barreras químicas para la germinación.
3. La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas, temperatura, gases y en ocasiones luz.

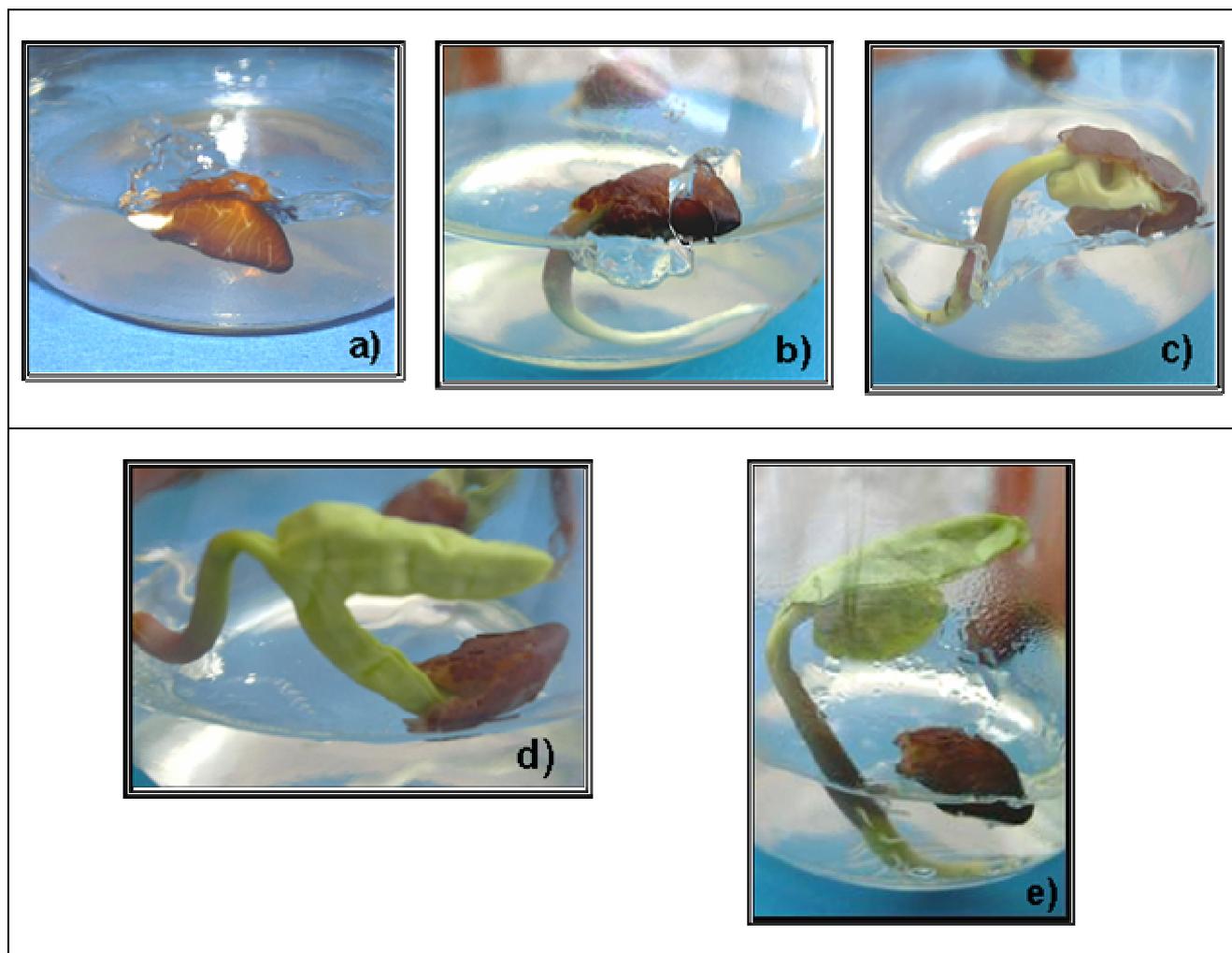


Figura 9. Semilla de *Ipomoea carnea* escarificada, germinación *in vitro* en medio MS al 50% de sales minerales

- a) Semilla con la radícula emergida a los 2 días de siembra
- b) Elongación de la radícula 3er día
- c) Rompimiento de la testa por los cotiledones 4to día
- d) Liberación de los cotiledones 5to día
- e) Plántula de *I. carnea*.

5.2.1 Escarificación mecánica

La maduración de las semillas incluye el desarrollo de mecanismos internos que controlan el inicio de la germinación, produciendo distintas clases de letargo. La interacción de la morfología del embrión y testa de la semilla y la fisiología de la misma, constituyen la base de los distintos tipos de letargo que permiten a las distintas familias botánicas, adaptarse a ambientes específicos.

En las semillas de la familia Convolvulaceae el letargo físico es característico, debido a la presencia de una testa dura e impermeable al agua o a los gases. El embrión está quiescente (no aletargado) pero se encuentra encerrado dentro de una cubierta impermeable que puede preservar las semillas con bajo contenido de humedad durante varios años.

Uno de los mecanismos para romper el letargo físico es la escarificación; éste consiste en cualquier proceso de romper, rayar y/o alterar mecánicamente o ablandar las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y los gases. Puede hacerse de forma mecánica, con aplicación de calor o agentes químicos, comúnmente ácidos.

La escarificación mecánica resulta simple y efectiva en muchas clases de semillas. Raspar con una lija la testa de las semillas, limarlas o quebrarlas con un martillo o pinza son métodos útiles para cantidades pequeñas de semillas relativamente grandes (Hartman y Kesler, 1994).

Tomando en cuenta las características de la testa de las semillas de la familia Convolvulaceae, a la cual pertenece *Ipomoea carnea* se realizó una prueba para comparar la respuesta de germinación en semillas escarificadas mecánicamente, raspando la testa con una lija, y semillas no escarificadas. La respuesta se muestran en la **Tabla 9**, El cuarenta y cinco por ciento de las semillas que fueron escarificadas germinaron al tercer día de siembra y el cien por ciento germinó a los cuatro días.

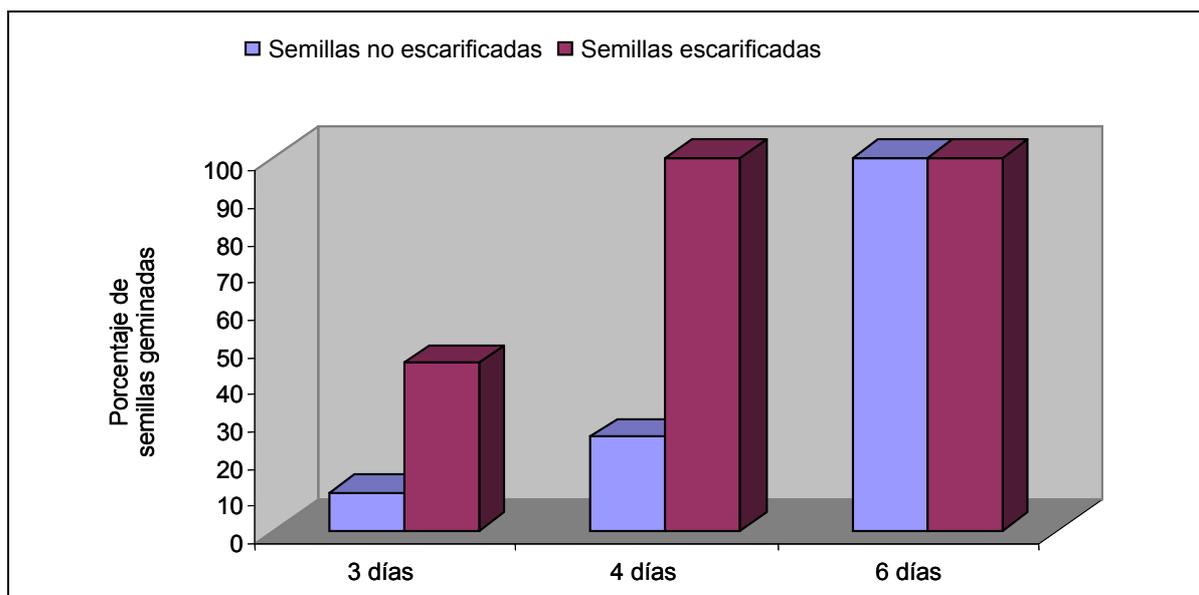
En cuanto a las semillas no escarificadas aunque tardaron 3 días más, el porcentaje de germinación alcanzado fue del 100%. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Knevel (2002) quien reportó que el porcentaje de germinación de las semillas de *Ipomoea pes-caprae* no escarificadas fue 0%. Mientras que el porcentaje de germinación para las semillas escarificadas alcanzó el 81%. Estos resultados apoyan la teoría de que la dormancia en muchas especies de la familia Convolvulaceae es causada por la dureza y grosor de la testa de las semillas.

Tabla 9. Porcentaje de germinación de semillas escarificadas y no escarificadas de *Ipomoea carnea*

TRATAMIENTO	TOTAL DE SEMILLAS	% SEMILLAS GERMINADAS 3 DÍAS	% SEMILLAS GERMINADAS 4 DÍAS	% SEMILLAS GERMINADAS 6 DÍAS
Semillas No escarificadas	20	10	25	100
Semillas escarificadas	20	45	100	100

Al realizar el análisis estadístico de los resultados de germinación se encontró una diferencia significativa $p < 0.001$ entre los tratamientos, con lo que podemos afirmar que la escarificación de las semillas de *I. carnea* nos ayuda a acelerar el proceso de germinación (**Fig. 10**).

Figura 10. Porcentaje de semillas germinadas escarificadas y no escarificadas a los 2, 4 y 6 días de siembra en medio MS al 50% de sales



El hecho de que el 100% de las semillas no escarificadas de *I. carnea* germinaran puede deberse a que durante la desinfección la testa de las semillas al estar en agitación y en contacto con líquido se suavizó, permitiendo que las semillas germinaran, aunque más lentamente.

A fin de acelerar el proceso de germinación las semillas utilizadas en los siguientes experimentos fueron escarificadas.

5.2.2 Efecto de la luz y la oscuridad en las semillas de *Ipomoea carnea*

Las semillas de las plantas cultivadas usualmente pueden germinar en luz u oscuridad. Sin embargo las plantas silvestres presentan mucha variabilidad en su respuesta hacia la luz. Las semillas pueden dividirse en aquellas que sólo germinan en la oscuridad, aquellas que sólo germinan en luz continua, las que germinan después de una breve iluminación y las que son indiferentes a la presencia de luz u oscuridad durante la germinación (Mayer y Poljakoff, 1982).

El efecto de la luz y la oscuridad en la germinación de las semillas de *Ipomoea carnea* se muestra en la (Tabla 10). Las semillas expuestas a la luz tuvieron una respuesta de germinación del 95.2 %, en tanto que en las semillas que permanecieron en condiciones de oscuridad la respuesta fue de 90.4 %. En ambos casos el registro de germinación se realizó al sexto día de siembra. Las semillas faltantes para alcanzar el 100% en cualquiera de las dos condiciones nunca germinaron, probablemente porque no eran viables.

De acuerdo con los resultados podemos decir que la luz no es un factor esencial para la germinación de las semillas de *Ipomoea carnea*.

Tabla 10. Germinación de semillas de *Ipomoea carnea* en condiciones de luz 16 h y 8 h oscuridad. 25 ± 2 °C. Medio MS al 50% de sales, pH 5.7, 30 g/L de sacarosa y 5 g/L de phytigel

Tiempo (días)	16 hrs luz		Oscuridad	
	respuesta	%	respuesta	%
0	0/42	0.0	0/42	0.0
3	38/42	90.4	35/42	83.3
6	40/42	95.2	38/42	90.4

5.3 Inducción de brotación múltiple

Para determinar el tipo de explante así como el tipo y concentración de reguladores de crecimiento adecuados para la inducción de brotación múltiple en *Ipomoea carnea*, se utilizaron plántulas de 13 días de edad germinadas *in vitro*.

El genotipo, edad y estado fisiológico de la planta madre de donde se obtiene el explante así como el tipo de explante, su tamaño, estafo fisiológico, y edad, son factores que influyen en el éxito del cultivo *in vitro*. Generalmente los explantes tomados de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a usar, mejor será la respuesta *in vitro*. En cuanto al tamaño del explante, se ha visto que a medida que éste es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento de tamaño es mayor el peligro de contaminación pero más rápido el crecimiento y la regeneración de las plantas (George y Sherrington, 1984; Pérez, 1998).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y las citocininas, juegan un papel muy importante. La concentración específica para conseguir la desdiferenciación celular o la inducción morfogénica, depende de varios factores como: el tipo de explante y de la especie vegetal (Pierick, 1990).

En 1957 Skoog y Miller plantearon el concepto de que la formación de órganos tenía un control hormonal de modo que, la diferenciación de la raíz y el brote depende de la proporción auxina-citocinina; concentraciones relativamente altas de citocinina promueven la formación de brotes y concentraciones relativamente altas de auxinas favorecen la formación de raíces.

5.3.1 Primera evaluación hormonal

La respuesta de brotación al emplear nudos cotiledonares fue satisfactoria, 100% de los explantes generaron brotes en todos los tratamientos que contenían una combinación de BAP y AIA. Los nudos que se colocaron en medio sin reguladores de crecimiento se elongaron formando un sólo brote con raíces adventicias. A diferencia de los nudos, en los cotiledones no se logró inducir brotación para ninguno de los tratamientos, pero se presentó la formación de raíces en la zona del pecíolo y la formación de callo compacto de color verde con o sin raíces en la zona del pecíolo y en los bordes de la hoja (**Fig. 11 a, b y c**).

Los cotiledones que se colocaron en medio sin reguladores de crecimiento presentaron la formación de raíces adventicias en la zona cercana al pecíolo o zona de corte (**Fig. 11 a**).

Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos por Vera (2005) con *Ipomoea murucoides* en donde al emplear los cotiledones como explante con diferentes concentraciones de AIA sola o en combinación con BAP, obtuvo raíces adventicias por morfogénesis directa y callos compactos con raíces adventicias por la vía de morfogénesis indirecta. Hernández (1998) reportó la formación de raíces cerca del pecíolo o la zona de corte en los cotiledones de *Helianthella quinquenervis* al emplear 1 mg/l de ANA.

En contraste con los reportes anteriores Vanegas *et al.* (2002) reportan la inducción de brotes en porciones de hoja de *Tagetes erecta* al emplear BAP y AIA.

En cuanto a la formación de raíces y callo tanto en nudo como en cotiledones se observó que en ausencia de citocinina no se generó callo y hubo formación de raíces, mientras que en la presencia de la citocinina sola o en combinación con auxina se generó callo con o sin raíces en la zona de corte, en la zona del pecíolo o hacia el borde de los explantes (**Fig. 11a, c, d y f**). Los resultados concuerdan con las respuestas que George & Sherrington (1984) sugieren y que puede presentar el tejido ante la combinación de auxinas y citocininas. Altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas propician la formación de raíces mientras que una combinación de auxinas y citocininas puede generar callo o brotes adventicios.

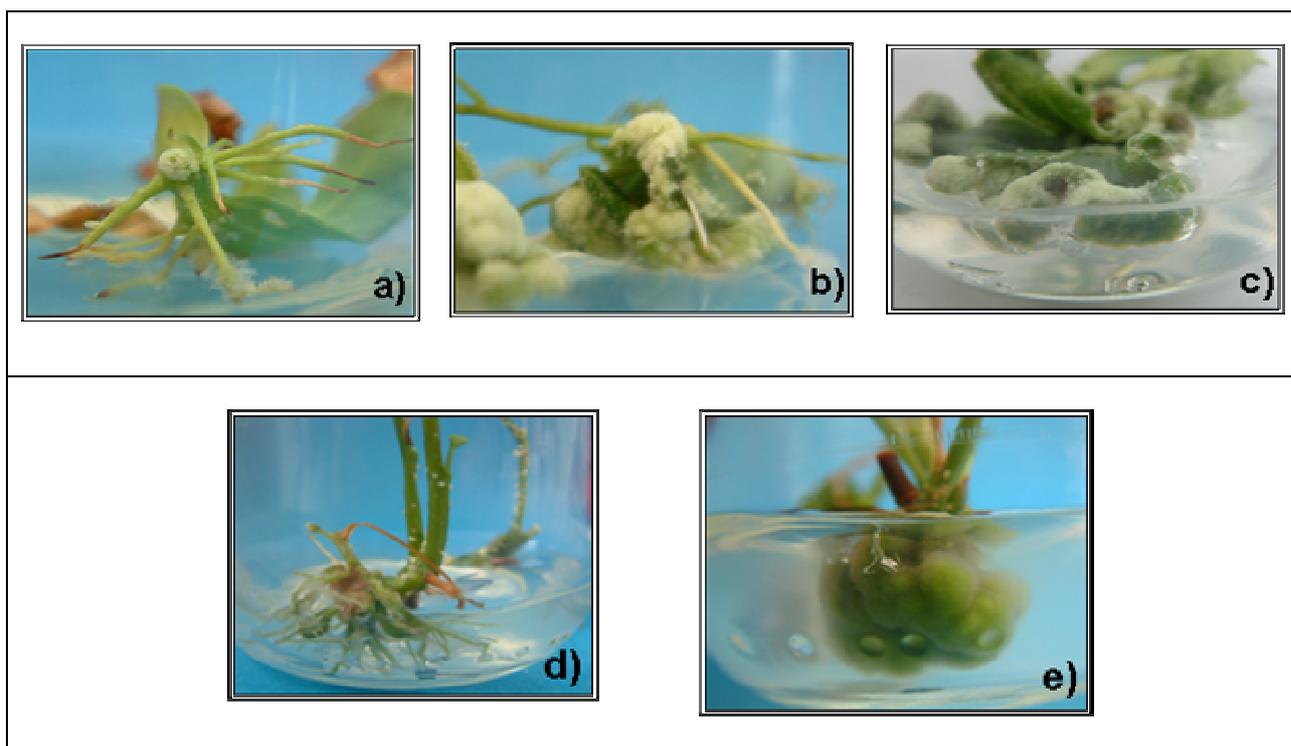


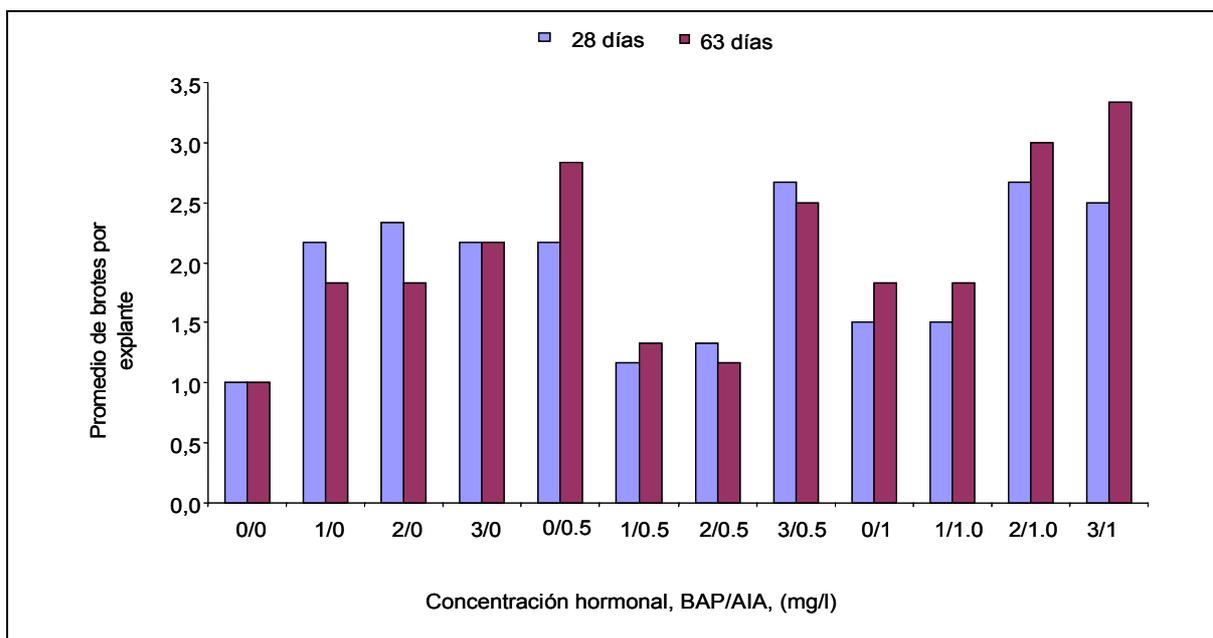
Figura 11. Formación de callo y raíces en nudos y cotiledones

- a) Formación de raíces en la zona del pecíolo del cotiledón en ausencia de citocinina.
- b y c) Formación de callo con o sin raíces en el cotiledón en presencia de citocinina sola o combinada con auxina.
- d) Formación de raíces en la base del nudo en ausencia de citocinina.
- e) Formación de callo en la base del nudo en presencia de citocinina con o sin auxina.

La **Figura 12** muestra el promedio de brotes generados a partir del nudo como resultado de los diferentes tratamientos con citocininas y auxinas a los 28 y 63 días. Se observa que los tratamientos que contienen 2 ó 3 mg/l de BAP y 0.5 ó 0 mg/l de AIA a mayor tiempo de cultivo, el promedio de brotes por explante es menor, esto se puede explicar por la formación de callo en la base del explante, el cual causó la muerte de algunos brotes.

Este tipo de respuesta es semejante a la reportada por Franca *et al.* (1995) en la especie *Styphnodendron polyphytum* ya que al utilizar BAP los explantes formaron callo en la base, y al emplear BAP en combinación con AIA aunque se formaron brotes, la presencia de callo en la base redujo el vigor de los brotes. Hernández (1996) tuvo una respuesta similar, al emplear BAP 5 mg/l obtuvo morfogénesis indirecta pero con marcadas malformaciones en tallo y hojas principalmente.

Figura 12. Formación de brotes *in vitro* a partir de nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* en medio MS adicionado con AIA y BAP en 2 tiempos de evaluación



Al analizar los resultados obtenidos de la interacción de AIA y BAP sobre la formación de brotes por explante en cada uno de los tratamientos, se registró una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$), entre las distintas concentraciones hormonales empleadas.

A los 28 días el mayor número de brotes por explante (2.67) se obtuvo en dos tratamientos uno adicionado con 3mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA y el otro con 2mg/l de BAP y 1mg/l de AIA. El segundo mejor tratamiento respecto al número de brotes formados fue el que presentaba 3 mg/l de BA combinado con 1mg/l de AIA donde se desarrollaron en promedio 2.5 brotes por explante (**Tabla 11**).

A los 63 días las mejores respuestas de brotación correspondieron a los tratamientos con las concentraciones más altas de BAP 2.0 y 3.0 mg/l en combinación con 1.0 mg/l de AIA formándose 3.0 y 3.33 brotes por explante respectivamente (**Tabla 11**). A pesar de que en estos tratamientos se formó callo en la base del explante y no se formaron raíces, los brotes generados presentaron buena apariencia y vigor, en contraste con la respuesta obtenida en la ausencia de BAP y 0.5 mg/l de AIA, donde se generaron brotes con raíces adventicias sin callo, pero el tejido no estaban bien diferenciado.

En ambos periodos, 28 y 63 días las concentraciones hormonales en que se formaron el menor número de brotes fueron con 1 y 2 mg/l de BA en combinación con 0.5 mg/l de AIA (Tabla 11).

Tabla 11. Promedio de brotes por explante a los 28 y 63 días de cultivo a partir de nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* cultivados *in vitro*, en medio MS adicionado con AIA y BAP

Tratamiento BAP/AIA (mg/l)	Prom. Brotes/explante 28 días	Prom. Brotes/explante 63 días
0/0	1,00 ^c	1,00 ^e
1/0	2,167 ^{abc}	1,83 ^{bcde}
2/0	2,33 ^{abc}	1,83 ^{bcde}
3/0	2,167 ^{abc}	2,17 ^{abcde}
0/0.5	2,167^{abc}	2,833^{abc}
1/0.5	1,167 ^{abc}	1,33 ^{cde}
2/0.5	1,333 ^{abc}	1,17 ^{de}
3/0.5	2,667^a	2,50^{abcd}
0/1	1,50 ^{abc}	1,83 ^{abcde}
1/1	1,50 ^{abc}	1,83 ^{abcde}
2/1	2,667^a	3,00^{ab}
3/1	2,50^{ab}	3,33^a

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

El balance auxinas-citocininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado, es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación (Orellana, 1998).

Con base en los resultados obtenidos podemos decir que en el caso de *I. carnea* los cotiledones no fueron un explante apropiado para la inducción de brotación, pero pueden resultar convenientes cuando se desea inducir la formación de callo o raíces adventicias. Por otra parte se decidió realizar otro experimento para probar la respuesta del ápice de brote y el nudo cotiledonar con diferentes concentraciones de BAP, sólo o en combinación con AIA para determinar el explante y las concentraciones en las que se generaba un mayor número de brotes.

5.3.2 Segunda evaluación hormonal

5.3.2.1 Formación de brotes a partir de nudos cotiledonares

De acuerdo con Litz y Jaiswal (1991) la micropropagación a partir de nudos es común para las especies tropicales y subtropicales mientras que el medio de cultivo y regulador de crecimiento más utilizados para inducir la formación de brotes son el medio MS (1962) y la citocinina BAP. Hu y Wang (1983) concuerdan en que la inducción de brotes adventicios se logra con la adición de citocininas en el medio de cultivo, y que en general la citocinina BAP es la más empleada para lograr dicha respuesta. Por otra parte Orellana (1998) menciona que, no obstante, el papel determinante de las citocininas en la brotación, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes y organización del tejido. (Orellana, 1998).

En el caso de *I. carnea* para inducir la formación de brotes se probaron la citocinina BAP sola o en combinación con la auxina AIA.

En la **Tabla 12** se muestra el promedio de brotes por explante formado a diferentes tiempos. De acuerdo con el análisis estadístico sólo se registró diferencia ($p < 0.05$) significativa para las diferentes concentraciones hormonales a los 14 días.

A los 14 días de cultivo el número de brotes fue muy similar en varios tratamientos, en promedio 4.0 por explante pero el tratamiento en el que el BAP y el AIA se encontraron a la misma concentración (1 mg/l) destacó porque se generó el menor número de brotes apenas 1.5 por explante. Diez días después, el promedio de brotes formados aumentó a 4.3 y 4.5 en los explantes que estaban en tratamientos con concentraciones de 4 y 2.5 mg/l de BAP en presencia o ausencia de citocinina.

Cumplidos 34 días de cultivo el número de brotes por explante disminuyó quedando con mayor número de brotes los explantes que se encontraban en el tratamiento que contenía 2.5 mg/l de BAB en ausencia de AIA, seguido por el tratamiento adicionado con 4mg/l de BAP y 1 mg/l de AIA

Tabla 12. Promedio de brotes por explante a los 14, 24, 34, días de cultivo a partir de nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* cultivados *in vitro*, en medio MS adicionado con AIA y BAP

Tratamiento BAP/AIA(mg/l)	Prom. brotes/explante 14 días	Prom. brotes/explante 24 días	Prom. brotes/explante 34 días
1/0	4.0a	4,17a	3.50a
2,5/0	3.667a	4.33a	4a
4/0	3.833a	4.5a	3,5a
1/1	1.5b	2.5a	2,83a
2,5/1	4.0a	4.5a	2,83a
4/1	4.0a	4.33a	3,67a

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

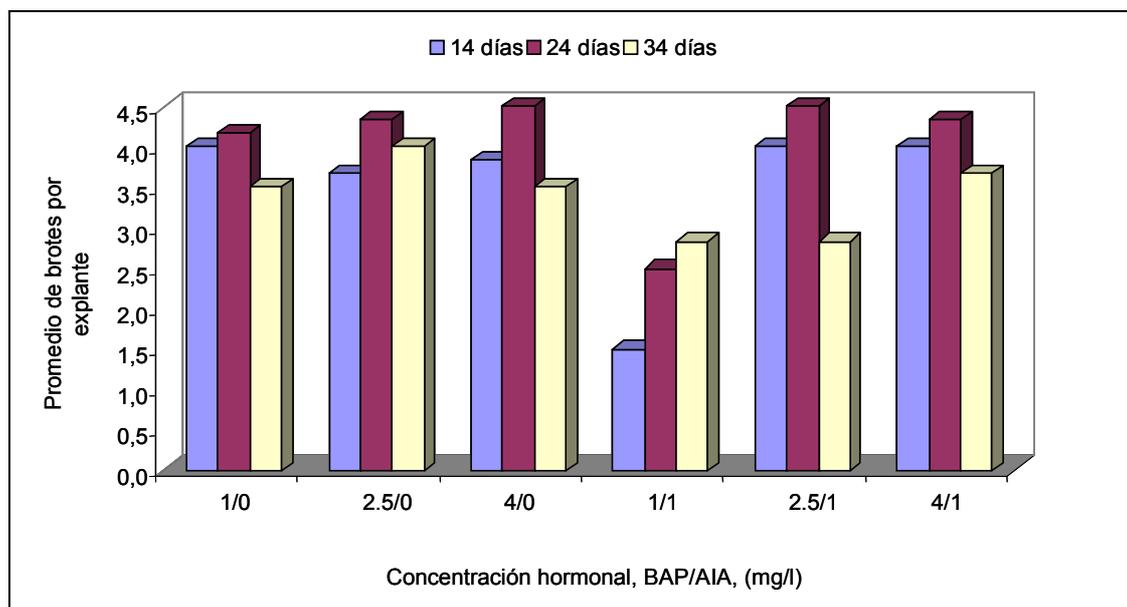
Brito y colaboradores (2002) reportan que la mejor concentración para generar brotación múltiple a partir de segmentos nodales de *Solanum incanum*, fue 4 mg/L de BAP en ausencia de auxinas. Muthukumar (2004) obtuvo con *Datura metel* brotación múltiple a partir de secciones nodales al añadir 3 mg/l BAP y 0.5 mg/l de NAA a medio MS.

Julini *et al.* (1999) reportan que la mejor respuesta de brotación en los explantes nodales de *Lippia junelliana* se obtuvo con el tratamiento que tenía la concentración más alta de BAP 4.4 μ M/l en combinación con 0.04 μ M/l de IBA.

De manera general la combinación en la que se formó el menor número de brotes fue aquella que contenía BAP y AIA en la misma proporción 1mg/l. Contrario a nuestra respuesta, Chand y Singh (2004) encontraron que la mejor respuesta de brotación en los nudos cotiledonares de *Pterocarpus Marsupium Roxb.* se obtenía al emplear bajas concentraciones de BAP 1mg/l en combinación de ANA 0.05 mg/l.

En la **Figura 13** se puede apreciar que el número de brotes alcanzó su máximo a los 24 días de cultivo y que a los 34 días la cantidad de brotes por explante disminuyó en cinco de los tratamientos, excepto en el que contenía 1 mg/l de BAP con 1mg/l de AIA. La disminución en el número de brotes fue provocada por la formación y crecimiento de callo en la base del nudo, probablemente éste interfiera con la toma de nutrientes y en consecuencia con el desarrollo de los brotes.

Figura 13. Formación de brotes *in vitro* a partir de nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* en medio MS adicionado con AIA y BAP a los 14, 24 y 34 días de cultivo



Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Kane *et al.* (1993) quienes reportan la formación de callo en la base de los explantes nodales al emplear BAP para inducir brotación. También en este caso el callo interfirió con la formación y desarrollo de los brotes. Por otra parte Wawrosch y colaboradores (1999) obtuvieron una respuesta semejante a la nuestra con los explantes nodales de *Swertia chirata*, de manera general el BAP resultó más eficiente que otras citocininas para inducir organogénesis, sin embargo el empleo de dicha hormona propició la formación de callo y la formación de brotes con un tamaño menor a 3 mm. Martin (2002) reportó la formación de callo en la zona de corte de los explantes nodales de *Holostema ada-kodien* cuando se cultivaron en medio adicionado con 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de IBA. Esta respuesta también se ha reportado en las siguientes especies: *Tylophora indica* (Sharma y Yelne, 1992), *Hemidesmus indicus* (Sharma y Yelne, 1995) y *Gymnema sylvestre* (Komalavalli y Rao, 2000).

De acuerdo con Marks y Simpson (1994) la formación de callo puede deberse a la acción de la auxina acumulada en zona basal de explante donde se realizó el corte, lo que estimula la proliferación celular especialmente en la presencia de citocininas. Preece *et al.* (1991) sugiere que la formación de callo en la zona de corte basal de los explantes nodales cultivados en medios enriquecidos con citocininas, se presenta frecuentemente en especies que ejercen una fuerte dominancia apical.

Una característica del cultivo de *I. carnea* fue la formación de callo en la base del explante desde los cuatro primeros días de siembra, conforme pasó el tiempo, el callo creció tanto que ocasionó el debilitamiento e incluso la muerte de algunos brotes. Con la finalidad de que los brotes que no habían sido afectados siguieran diferenciándose, los explantes se aislaron del callo y se subcultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento.

La evaluación de los brotes se registró a los diez y veinte días del aislamiento, diferenciando siempre de qué tratamiento hormonal provenían.

Una vez separado el callo, la respuesta que se obtuvo fue positiva para todos los explantes, los brotes sobrevivientes se recuperaron y se presentó la formación de nuevos brotes llegando a un promedio de 5.83 por explante (**Tabla 13**). Al realizar el análisis estadístico se registró una diferencia ($p < 0.05$) significativa para las diferentes concentraciones hormonales de las que provenían los explantes. Cabe mencionar que el callo no volvió a generarse y que en su lugar aparecieron raíces adventicias.

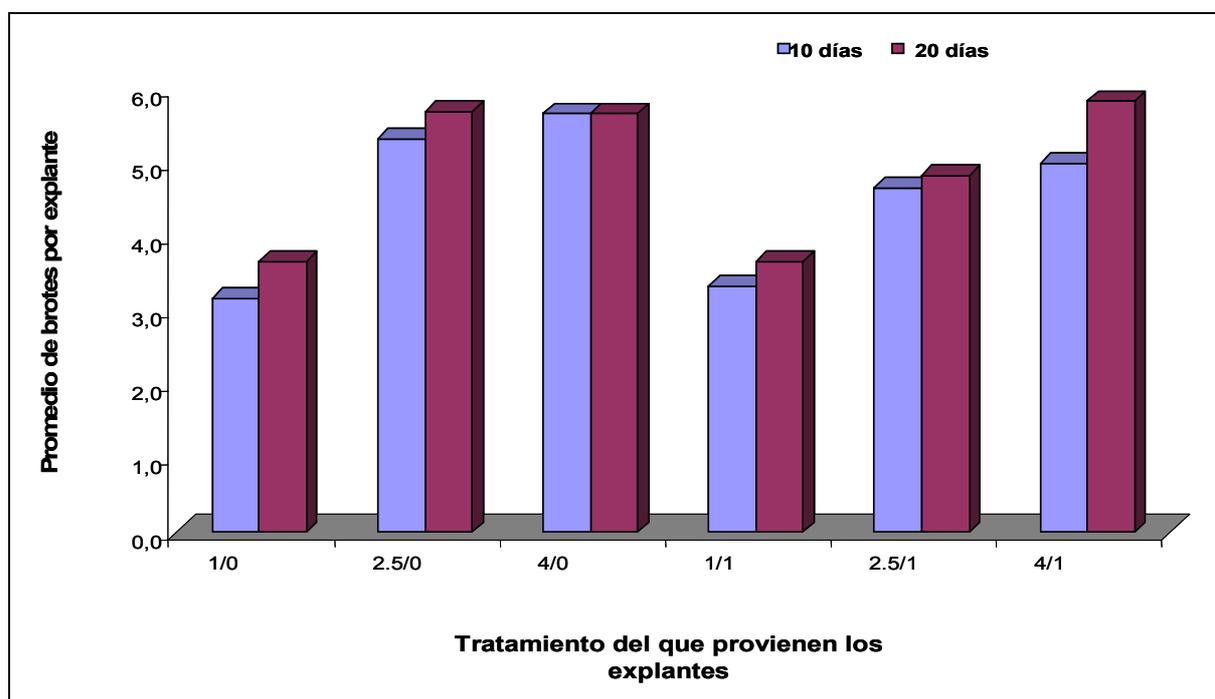
Tabla 13. Promedio de brotes por explante a los 10 y 20 días de que los nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* se aislaron del callo y se cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento

Tratamiento BAP/AIA(mg/l)	Prom. brotes/explante 10 días s/callo	Prom. brotes/explante 20 días s/callo
1/0	3,17 ^c	3,67 ^b
2,5/0	5,33^{ab}	5,7^a
4/0	5,67^a	5,67^a
1/1	3,33 ^{bc}	3,67 ^b
2,5/1	4,67 ^{abc}	4,83 ^{ab}
4/1	4,5^{abc}	5,83^a

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

En la **Figura 14** se observa que los explantes que generaron el menor número de brotes a los 10 y 20 días de que se retiró el callo provenían del tratamiento donde el BAP y el AIA se encontraban en la misma concentración 1 mg/l. También se aprecia que, en general la mejor respuesta se obtuvo en los explantes que provenían de tratamientos en los que el BAP estaba en concentraciones de 2.5 o 4 mg/l.

Figura 14. Formación de brotes *in vitro* a partir de nudos cotiledonares de *Ipomoea carnea* sin callo en medio MS sin reguladores de crecimiento a los 10 y 20 días de cultivo



De acuerdo al número de brotes por explante que se generó, la mejor respuesta se obtuvo en los explantes que provenían del tratamiento con 4 mg/l de BAP y 1mg/l de AIA (**Tabla 13**). Sin embargo también se evaluó la apariencia de los brotes y la organización del tejido. En este sentido, los brotes que provenían del segundo mejor tratamiento adicionado con 2.5 mg/l de BAP y en ausencia de AIA presentaban muy buena apariencia, tenían hojas más desarrolladas y eran más cortos que los brotes que habían estado con la auxina. El alargamiento de los brotes que se generaron en presencia de AIA puede atribuirse a que uno de los efectos de las auxinas en los tejidos vegetales es el alargamiento celular (**Figura 15 a y b**).

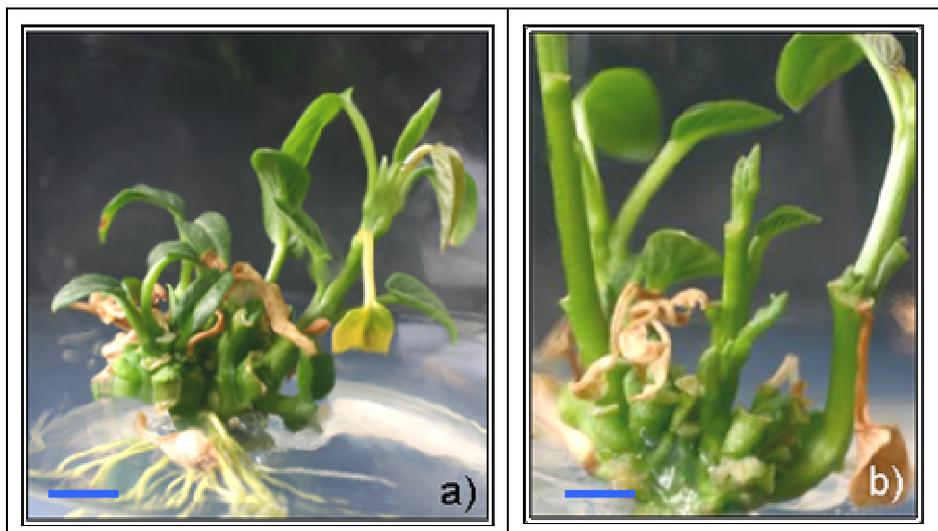


Figura 15. Brotes aislados

a) Brotes generados en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de BAP y 0 mg/l de AIA a los 20 días de haber separado el callo

b) Brotes generados en medio MS adicionado con 4 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIA a los 20 días de haber separado el callo

Barra = 5mm

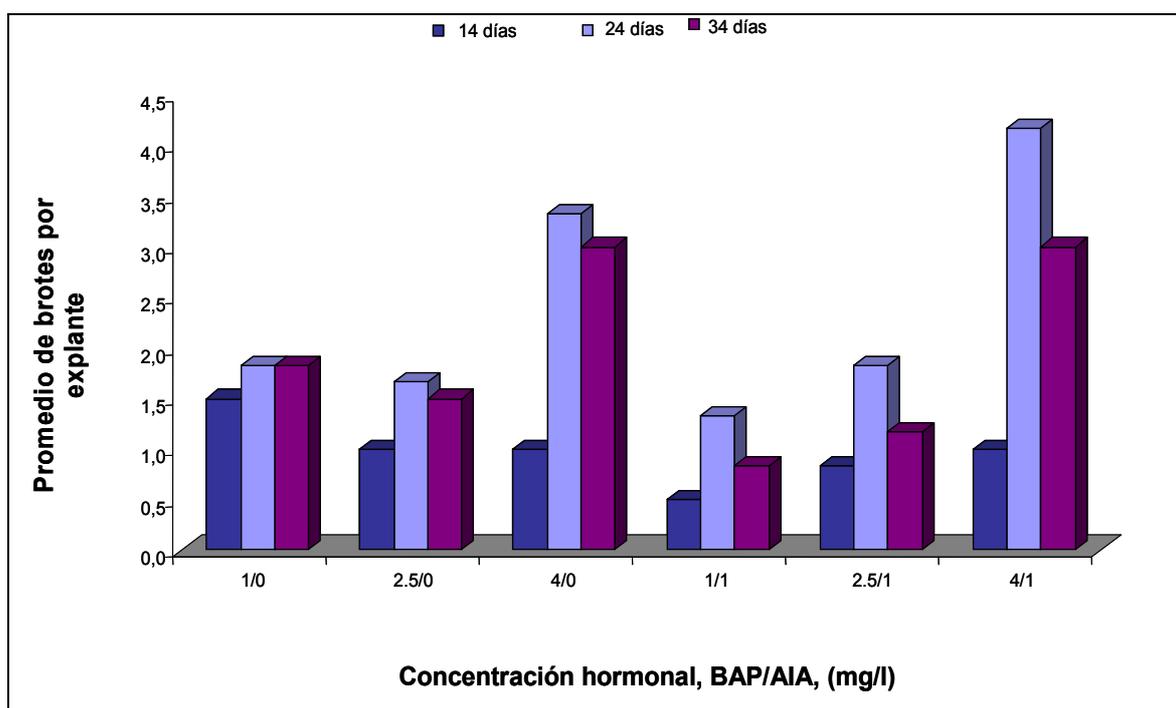
Tomando en cuenta los resultados obtenidos podemos decir que para hacer eficiente la brotación múltiple es necesario cultivar los explantes en un medio con hormonas por un corto periodo de tiempo posteriormente retirar el callo que se haya formado en la base del explante para evitar que los brotes generados sean afectados y finalmente colocar los brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento para que terminen de diferenciarse y elongarse.

5.3.2.2 Formación de brotes a partir de ápices de brote

Al igual que con los nudos cotiledonares, para inducir la formación de brotes en los ápices de brote de *I. carnea* se probaron la citocinina BAP sola o en combinación con la auxina AIA.

La **Figura 16** muestra el promedio de brotes obtenidos a partir de los ápices de brote, como resultado de la interacción de distintas concentraciones de BAP y AIA, a los 14, 24 y 34 días de cultivo. Se observó que los mejores tratamientos fueron aquellos en los que el BAP se encontraba a mayor concentración 4 mg/l. En este sentido Taiz (1998), establece que para muchas especies vegetales la aplicación directa de citocininas al medio de cultivo estimula el crecimiento de yemas laterales, anulando el efecto inhibitor del meristemo apical de brote.

Figura 16. Formación de brotes *in vitro* a partir de ápices de brote de *Ipomoea carnea* en medio MS adicionado con AIA y BAP en 3 tiempos de evaluación



En la **Tabla 14** se muestra el promedio de brotes por explante formado a diferentes tiempos. De acuerdo con el análisis estadístico se registró una diferencia significativa ($p < 0.05$) para algunas concentraciones hormonales.

A los 14 días de cultivo el mayor número de brotes fue de 1.5 por explante con la concentración de 1 mg/l de BAP en ausencia de AIA. A los 24 días de tratamiento, el promedio de brotes formados aumentó de 1 a 3.3 en los explantes expuestos al tratamiento con 4 mg/l de BAP y de 1 a 4.167 en el tratamiento con 4 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIA.

Cumplidos 34 días de cultivo el número de brotes por explante disminuyó. Los explantes que se encontraban en los tratamientos que contenía 4 mg/l de BAB en ausencia de AIA y 4 mg/l de BAP con 1 mg/l de AIA quedaron con el mayor número de brotes, 3 en promedio. Al igual que con los nudos la causa de la muerte o debilitamiento de los brotes fue la formación de callo en la base del ápice.

Los tratamientos hormonales en los cuales se formó el menor número de brotes en las tres observaciones realizadas, fueron aquellos en los que se encontraba presente en el medio de cultivo 1 mg/l de BAP y 1mg/l de AIA obteniéndose a los 34 días de cultivo un promedio de 0.83 brotes por explante.

Tabla 14. Promedio de brotes por explante a los 14, 24 y 34, días de cultivo a partir de ápices de brote de *Ipomoea carnea* cultivados *in vitro*, en medio MS adicionado con AIA y BAP

Tratamiento BAP/AIA(mg/l)	Prom. brotes/explante 14 días	Prom. brotes/explante 24días	Prom. brotes/explante 34días
1/0	1.50 ^a	1.83 ^{ab}	1.83 ^{ab}
2,5/0	1.0 ^{ab}	1.67 ^b	1.50 ^{ab}
4/0	1.0 ^{ab}	3.3 ^{ab}	3.00^a
1/1	0.50 ^b	1.3 ^b	0.83 ^b
2,5/1	0.83 ^b	1.83 ^b	1.167 ^b
4/1	1.0 ^{ab}	4.167 ^a	3.0 ^a

NOTA: Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Al igual que en los explantes nodales, los ápices presentaron la formación de callo en la zona de corte, esto coincide con lo observado por Anju y Pawan (1992) quienes mencionan que al adicionar citocininas al medio de inducción de *Vigna radiata* se propiciaba la formación de callo en la base de los ápices.

Para evaluar si los ápices presentaban la misma capacidad de recuperación que los nudos se eliminó el callo que se había formado en la base del explante y se sembraron en medio MS sin reguladores de crecimiento.

En la **Tabla 15** se muestra la respuesta de los explantes a los 10 y 20 días de haber sido aislados del callo. De acuerdo con el análisis estadístico no hubo diferencia significativa para las diferentes concentraciones hormonales.

A diferencia de los nudos cotiledonares, los ápices no presentaron la misma capacidad de regeneración, en algunos de los explantes disminuyó el número de brotes y en otros el aumento en el promedio de brotes fue mínimo.

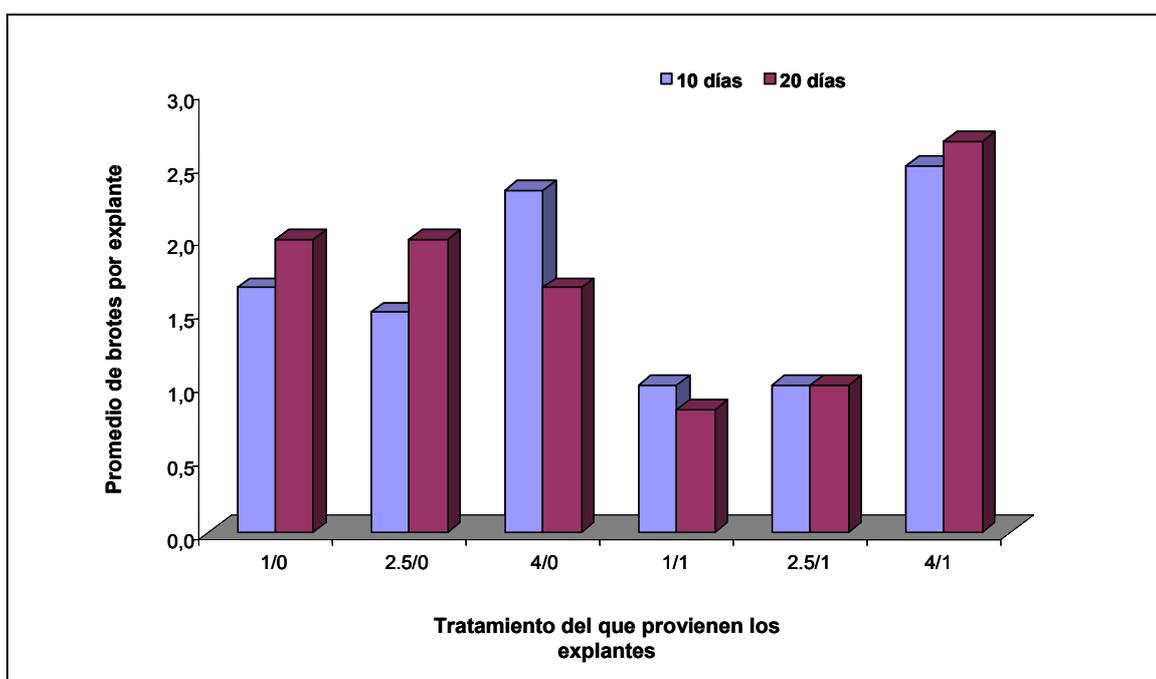
Una vez separado el callo, se generaron raíces en la base del explante, al igual que sucedió con los nudos.

Tabla 15. Promedio de brotes por explante a los 10 y 20 días de que los ápices de *Ipomoea carnea* se aislaron del callo y se cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento

Tratamiento BAP/AIA(mg/l)	Prom. brotes/explante 10 días s/callo	Prom. brotes/explante 20 días s/callo
1/0	1.67 ^a	2.0 ^a
2,5/0	1.5 ^a	2.0 ^a
4/0	2.3 ^a	1.67 ^a
1/1	1.0 ^a	0.83 ^a
2,5/1	1.0 ^a	1.0 ^a
4/1	2.5^a	2.67^a

En la **Figura 17** se observa que los ápices que generaron el menor número de brotes a los 10 y 20 días provenían de del tratamiento donde el BAP y el AIA se encontraban en la misma concentración 1 mg/l. También se aprecia que, en general la mejor respuesta se obtuvo en los explantes que provenían del tratamiento adicionado con 4mg/l de BAP y 1 mg/L de AIA

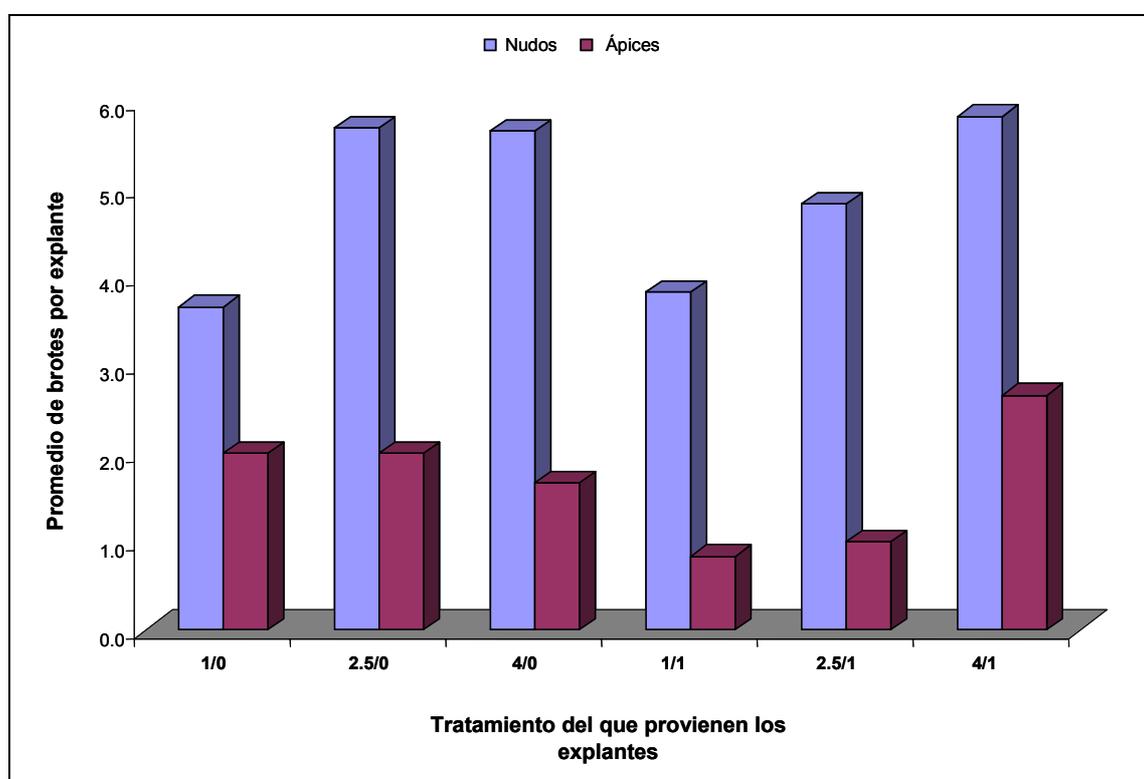
Figura 17. Formación de brotes *in vitro* a partir de ápices de *Ipomoea carnea* sin callo en medio MS sin reguladores de crecimiento en 2 tiempos de evaluación



5.3.2.3 Nudos cotiledonares y ápices de brote

En la **Figura 18** se observa el comportamiento que presentaron los ápices y los nudos cotiledonares con diferentes concentraciones de BAP y AIA, respecto a la formación de brotes por explante, en la última toma de datos, realizada a los 20 días de que los explantes se habían aislado del callo. La respuesta de los nudos fue mayor que la de los ápices para todos los tratamientos.

Figura 18. Formación de brotes *in vitro* a partir de ápices y nudos de *Ipomoea carnea* en medio MS sin reguladores de crecimiento a los 20 días de aislado el callo



La respuesta morfogénica en *Ipomoea carnea*, a partir del cultivo de nudos cotiledonares y ápices de brote en medio MS modificado, fue diferencial respecto al número de brotes formados, siendo el primero el que tuvo mayor respuesta. En la mayoría de los ápices se observó abundante formación de callo, oxidación, necrosis de los explantes y baja capacidad de recuperación de los brotes después de que se retiró el callo de la base del explante (**Fig. 19 a, b y c**).

A diferencia de los ápices los nudos cotiledonares dieron una mejor respuesta a la inducción en los diferentes tratamientos y la capacidad de recuperación y formación de nuevos brotes después de que el nudo se aisló del callo fue mayor que en los ápices (**Fig. 19 d y e**).

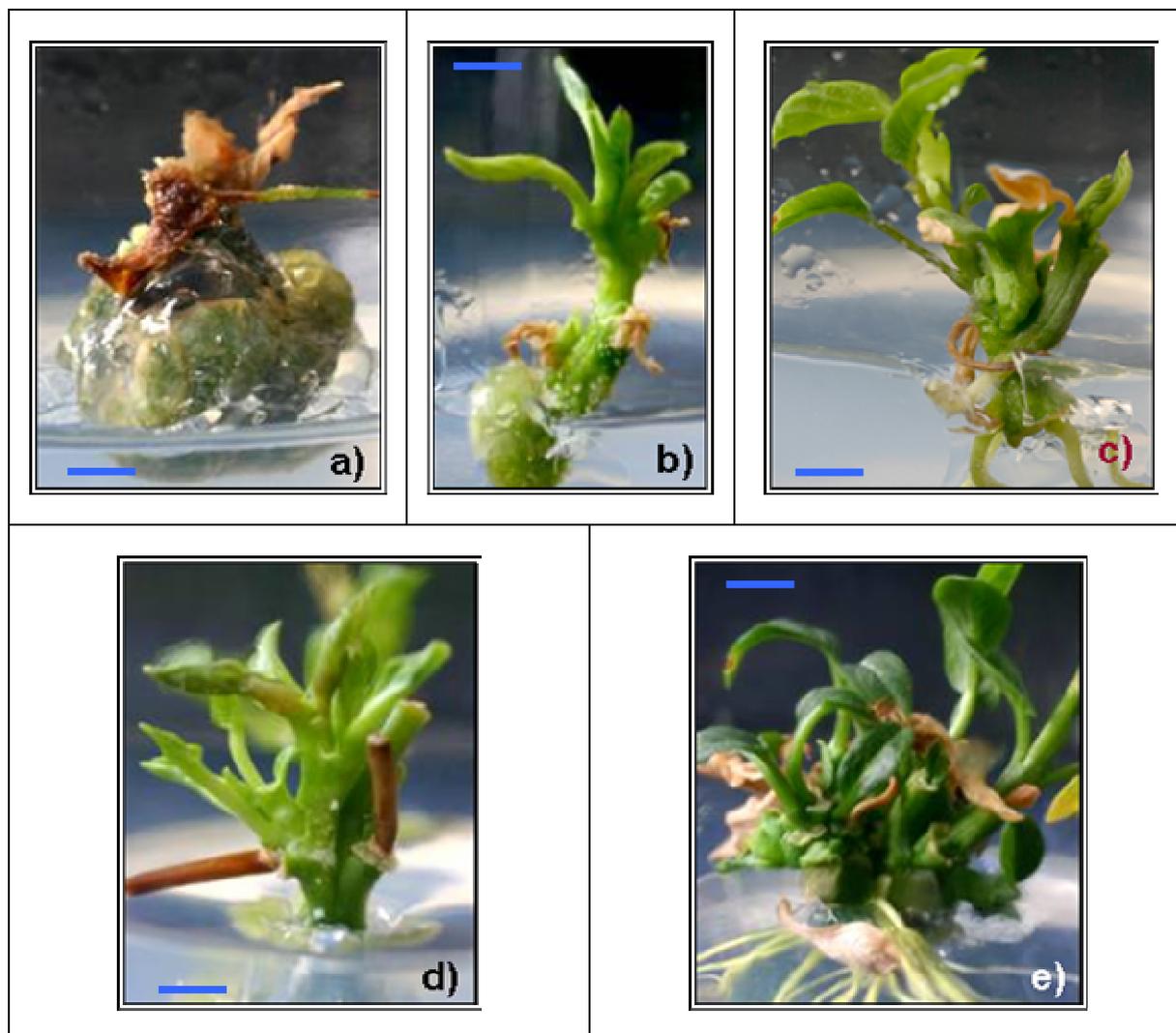


Figura 19. Formación de brotes en ápices y nudos de *Ipomoea carnea*

- a) Formación de callo y oxidación del ápice.
 - b) Formación de brotes en el ápice.
 - c) Brotes en el ápice después de 20 días sin callo.
 - d) Formación de brotes en el nudo.
 - e) Brotes en el nudo después de 20 días sin callo.
- Barra = 5mm

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Amin *et al.* (2003) quienes reportaron la inducción de brotación múltiple a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales y apicales de *Paederia foetida* y encontraron que la capacidad de proliferación de los nudos era significativamente mayor que la de los ápices de brote. Begum y colaboradores (2002) también reportaron que los nudos de *Ocimum basilicum* generaron mayor número de brotes que los ápices.

La respuesta diferencial de nudo y ápices se puede explicar considerando los siguientes aspectos: 1) diferenciación celular, 2) dominancia apical y 3) reguladores de crecimiento.

Hacia el ápice existe una mayor diferenciación celular de los tejidos; debido a que en esta zona se forma el primer meristemo que dará origen al resto de las estructuras que conformarán a la planta, se trata del meristemo apical de brote, el cual ejerce una dominancia apical sobre el resto de los tejidos de la planta inhibiendo la formación de yemas laterales este mecanismo está regulado por las auxinas producidas en el mismo ápice. Una manera de suprimir la dominancia apical es la remoción del meristemo apical de brote, lo cual, generalmente, resulta en el crecimiento de una o más yemas laterales (Taiz, 1998). Al romperse la dominancia apical las células presentan un mayor grado de plasticidad morfogénica y también un menor grado de determinación genética, lo cual abre la posibilidad de inducir un proceso de rediferenciación celular para estimular la formación de centros meristemáticos que den lugar al surgimiento de yemas adventicias.

En la propagación *in vitro* es común la adición de altas concentraciones de citocininas al medio de cultivo con la finalidad de liberar la dominancia apical y estimulan la formación de yemas adventicias.

5.4 Enraizamiento

En esta fase, cada brote, cada esqueje o yema que se ha formado durante la fase de multiplicación se individualiza y se cultiva y manipula *in vitro*, para que además de crecer y desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces adventicias que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al transplantarse a un sustrato enriquecido y convertirse en una planta aclimatizada lista para llevarse al campo (Orellana, 1998).

Gracias a los trabajos de Skoog y Miller (1957) se sabe que cuando al medio de cultivo se añaden concentraciones relativamente altas de auxinas y concentraciones bajas o nulas de

citocininas se favorecen la formación de raíces. Por esta razón, en la mayoría de los trabajos de micropropagación se reporta el uso de auxinas para inducir el enraizamiento de los brotes.

Kane (1993) reporta que del total de brotes de *Ipomoea pes-caprae* que se subcultivaron a medio MS completo o al 50% de sales, sólo el 32% de los brotes formaron raíces. Cuando al medio se le añadió IBA, se incrementó el porcentaje de enraizamiento así como el número de raíces por brote. El máximo porcentaje de enraizamiento (95%) se alcanzó cuando los brotes se sembraban en medio MS completo adicionado con 1.0 mg/L de IBA.

Sin embargo, George y Sherrington (1984) mencionan que algunas especies sólo necesitan que los brotes se transfieran a un medio libre de hormonas para inducir la rizogénesis. Como es el caso de *Ipomoea carnea*, donde la aparición y desarrollo de las raíces ocurrió de manera espontánea en el 100% de los brotes, tanto en aquellos provenientes del ápice como los provenientes del nudo cotiledonar (**Fig. 20**).

El desarrollo de raíces sin la necesidad de utilizar alguna auxina puede explicarse porque las auxinas son sintetizadas principalmente en el ápice del tallo, ramas jóvenes y en general en los meristemos (Rojas y Ramirez, 1993). Partiendo de que los brotes jóvenes en desarrollo, son una rica fuente en la producción de auxinas, la adición de éstas a los medios de cultivo para enraizamiento puede resultar innecesaria para algunas especies (Orellana, 1998). En este sentido Vanegas y colaboradores (2002) lograron que los brotes de *Tagetes erecta* se elongaran y desarrollaran raíces normales, al colocarlos en medio MS libre de reguladores de crecimiento.

Por otra parte Zárate (1997) consiguió el enraizamiento de las plántulas de *Atropa baetica* en tres diferentes medios; MS completo sin reguladores de crecimiento, MS adicionado con 0.125 y 0.25 mg/L de ANA. En estos dos medios la respuesta fue más rápida y el número de raíces fue mayor, sin embargo, debe tomarse en cuenta que las plantas que murieron durante la aclimatización fueron aquellas que se enraizaron en el medio que contenía 25 mg/L de ANA. Esto sugiere que altas concentraciones de ANA tuvieron un efecto negativo para la aclimatización de las plantas.

Además de los reguladores de crecimiento, otras variables están involucradas en la rizogénesis. Hu y Wang (1983) mencionan que algunas veces, la formación de raíces no puede iniciarse en medios con alta concentración de sales, aún cuando se hayan agregado

reguladores de crecimiento. Al reducir las sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la concentración del medio, se logra la formación abundante de raíces. Hydman *et al.* (1982) coinciden en que una de las variables que se pueden controlar durante el enraizamiento *in vitro* es la concentración de sales. Con respecto a la concentración de sacarosa, George y Sherrington (1984) señalan que la presencia de sacarosa en el medio es esencial para el enraizamiento *in vitro* de muchas especies. Orellana (1998) menciona que es recomendable mantener o aumentar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. En caña de azúcar se observa un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5 y 9 % de sacarosa (Maretzki, 1980; Ballester, 1983, citados por Orellana, 1998).

La individualización de los brotes de *I. carnea* y su transplante a medio MS al 50% de concentración de sales y 30 g/l de sacarosa permitió que éstos pudieran desarrollarse, formaran nuevas hojas y raíces, aumentaran su talla y tuvieran mayor diferenciación. Esto lo atribuimos a que los brotes unidos al explante, competían por el espacio y los nutrientes ocasionando un desarrollo asincrónico, es decir algunos brotes ya se habían desarrollado en plántulas mientras que otros apenas se apreciaban como yemas (**Fig. 20 a y b**).

La aparición de raíz en la base de los brotes se observó al quinto día de que estos se individualizaron y colocaron en el medio para enraizamiento (**Fig. 20 c**). Al décimo día el 100% de los brotes habían generado vía organogénesis directa de 2 a 15 raíces principales de 2.0 mm de grosor con abundantes raíces secundarias y de consistencia compacta (**Tabla 16**), (**Figura 20**).

Tabla 16. Formación de raíz *in vitro* en los brotes de *Ipomoea carnea* en medio MS al 50 % de sales, 30 g/l de sacarosa, 5 g/l phytigel, 25° C \pm 2, 16 h luz / 8 oscuridad

ENRAIZAMIENTO	RESPUESTA	%	RESPUESTA
80 brotes	80/80	100	Raíz principal 2.0 mm con raíces adventicias abundantes de aspecto vigoroso y compactas. Abundancia: 2 a 15 raíces

Los brotes permanecieron 30 días en el medio de enraizamiento para que formaran plantas completas y alcanzaran una talla adecuada para su aclimatización.

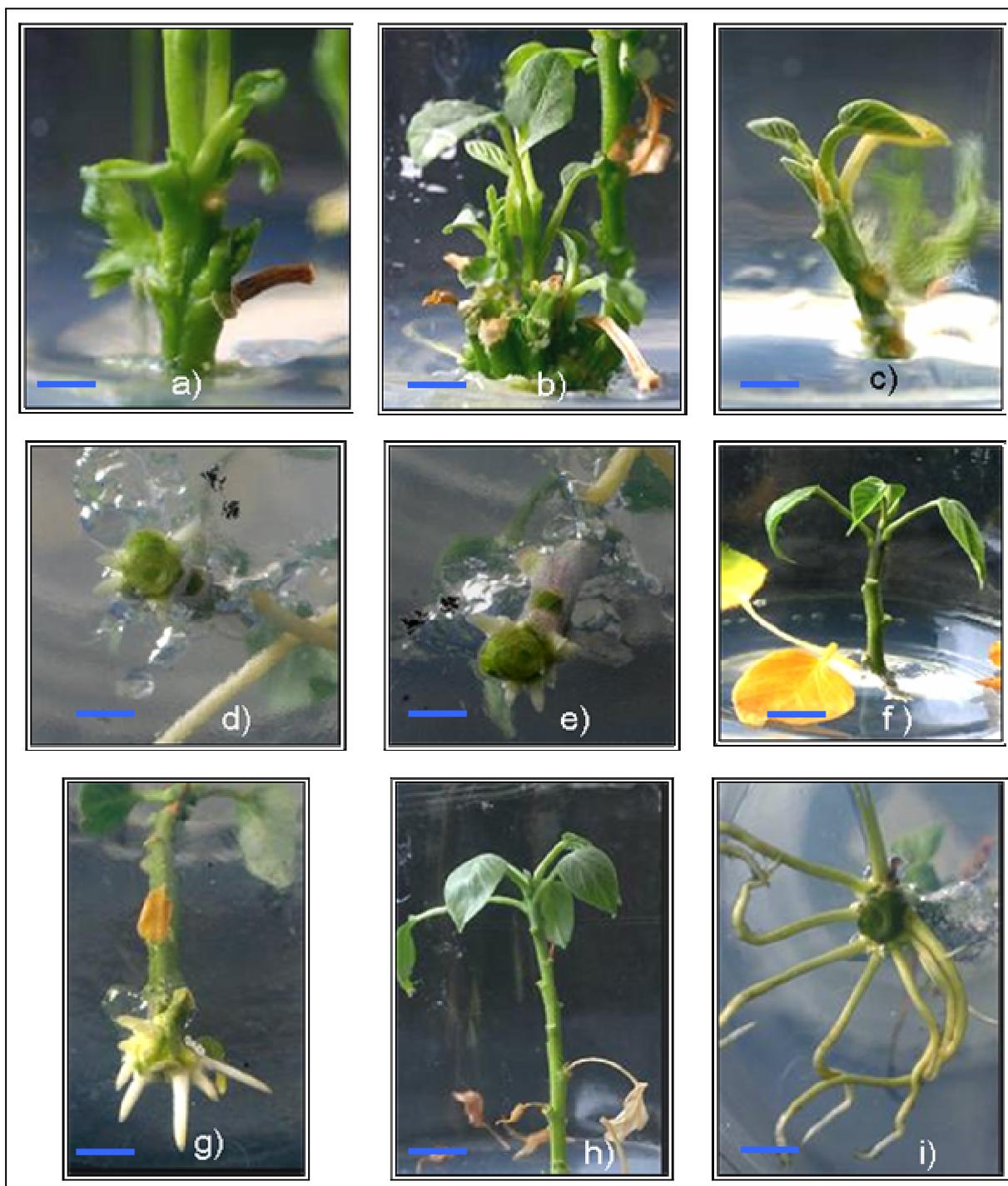


Figura 20. Individualización de un brote, crecimiento y desarrollo de raíces

- a y b) Crecimiento asincrónico de los brotes
 - c) Brote individualizado
 - d y e) Aparición de la raíz al quinto día de individualización
 - f) Brote a los cinco días de individualización
 - g) Raíces al séptimo día
 - h) Brote diez días después de la individualización
 - i) Raíces a los diez días.
- Barra = 5mm

5.5 Aclimatización

La transferencia de plantas *in vitro* y su aclimatización *ex vitro* es la última fase de la micropropagación, pero frecuentemente la más crítica, pues del resultado depende en gran medida de la cantidad y calidad final de las plantas y en consecuencia la eficiencia total del sistema de micropropagación (Agramonte *et al.*, 1998; Hazarika, 2003; Kadleček *et al.*, 2001).

El término aclimatización se refiere al paso de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo*. Es común que las palabras aclimatación y aclimatización se usen como sinónimos pero de acuerdo con la connotación de horticultura, aclimatación denota el proceso durante el cual las plantas u otros organismos, comienzan a ajustarse a un nuevo clima o situación que resulta de un proceso natural, mientras que la aclimatización implica la transición de las condiciones *in vitro* a las *in vivo* bajo la intervención y guía del hombre (Debergh, 1991).

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan anomalías en la anatomía y la fisiología de las plantas que las hace diferentes de las que crecen en invernaderos o en el campo. Las plantas cultivadas *in vitro* tienen tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, menos tejidos mecánicos de soporte, mayor cantidad de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo (Denng y Donnelly, 1993; Kadleček *et al.* 2001; Pospisilova *et al.*, 1999)

Las características anatómicas y fisiológicas de las plantas micropropagadas, ocasionan que una gran parte ellas no sobrevivan al cambio de condiciones *in vitro* a condiciones ambientales, en las que las plantas pierden agua rápidamente debido a que la humedad atmosférica es más baja y la intensidad luminosa es mayor. Por esta razón es necesario un periodo de aclimatización durante el cual las anomalías puedan ser corregidas y se asegure que un número suficiente de plantas sobrevivan y crezcan vigorosas cuando se transfieran a campo (Agramonte *et al.*, 1998; Hazarika, 2003).

En general, durante la aclimatización se busca reducir la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa de forma gradual, que las plantas se adapten a la temperatura ambiental y desarrollen nuevas hojas y raíces.

En el caso de *Ipomoea carnea* ochenta plántulas enraizadas que presentaron una altura de 5 a 7 cm se distribuyeron formando 4 lotes y se sembraron en charolas de plástico con una mezcla estéril de sphagnum, agrolita y tierra de hoja en relación 1:1:1. Las plántulas se adaptaron sin problema alguno al tipo de suelo y a las condiciones de humedad que se mantuvieron altas con ayuda de cubiertas de plástico.

Aún cuando el riego de las plantas se realizó cada tercer día con un aspersor para evitar la excesiva humedad del sustrato, se formaron hongos en el mismo. A fin de eliminar y evitar la nueva formación de hongos, tanto en plantas como en suelo fueron regados una vez por semana con una solución de Captan (fungicida) 1g/l durante 4 semanas, logrando controlar la formación de hongos.

La reducción de la humedad relativa se llevó a cabo durante 40 días, con la finalidad de que las plantas se adaptaran a las nuevas condiciones y tuvieran el tiempo necesario para normalizar el mecanismo de apertura y cierre estomático y mejorar la producción de cutícula, que se traduce en menor transpiración cuticular (Pierik, 1990).

En muchas especies de plantas, las hojas y raíces formadas *in vitro*, no tienen la capacidad para seguir desarrollándose en condiciones *ex vitro*, por lo que éstas son reemplazadas por la formación de nuevas hojas (Preece & Sutter, 1991; Diettrich *et al.*, 1992, citados por Pospíšilová *et al.*, 1999). En el caso de *Ipomoea carnea*, durante el periodo de aclimatación las plantas alcanzaron una altura de 28 cm y se observó el desarrollo de nuevas estructuras como hojas, brotes y raíces de apariencia normal.

Tabla 17. Porcentaje de sobrevivencia de plantas aclimatizadas evaluadas a los 60 días

LOTE	NO. DE PLANTAS	NO DE PLANTAS ACLIMATIZADAS	PORCENTAJE
1	20	20	100%
2	20	20	100%
3	20	20	100%
4	20	20	100%

Las plantas respondieron favorablemente a la reducción de humedad y transcurridos 40 días, las cubiertas de plástico se retiraron completamente, Después de 60 días de haber retirado las cubiertas, el porcentaje de sobrevivencia obtenido fue del 100%, (**Tabla 17**).

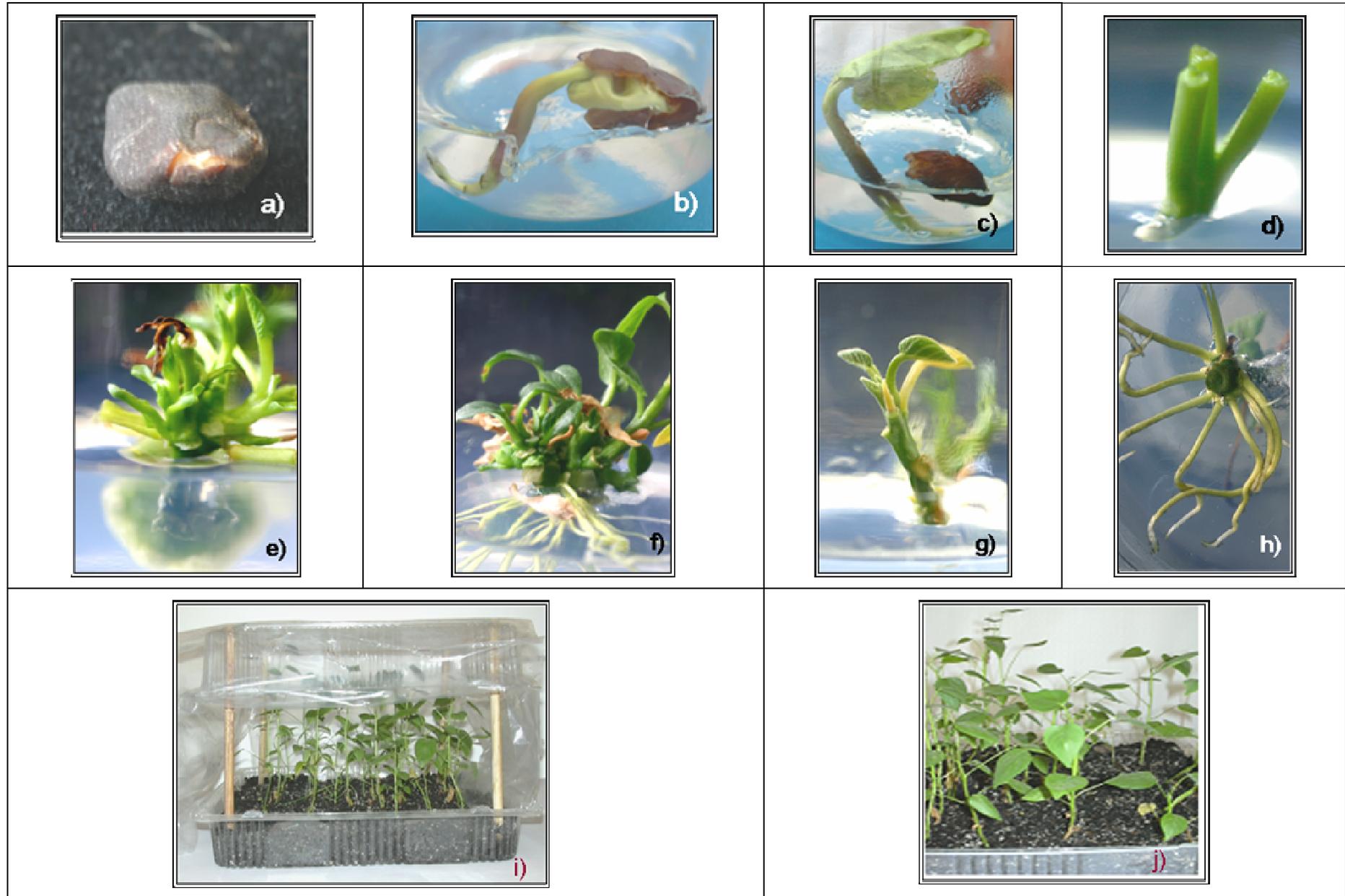
Los porcentajes de sobrevivencia reportados para algunas plantas con actividad biológica de diversas familias propagadas *in vitro*, son variables.

Kane *et al.* (2003) reportan el 100% de sobrevivencia para plantas de *Ipomoea pe-caprae* (Convolvulaceae) después de haber permanecido dos semanas con una cubierta de plástico que mantenía alta la humedad relativa. Joshi y colaboradores (2003) obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 66.7% con plantas de *Sasurrea obvallata* (Asteraceae) utilizando una mezcla de suelo, peatmoss y soilrite (2:1:1 v/v) y después de permanecer con una cubierta de plástico durante 12 días.

Tabla 18. Secuencia cronológica de la micropropagación de *Ipomoea carnea*, desde la germinación hasta la aclimatización, a partir del cultivo *in vitro* de nudos cotiledonares y ápices de brote en medio MS modificado

SIEMBRA DE SEMILLAS	Periodo
Germinación	3 días
Plántula con cotiledones	3 días
Plántula con cotiledones y hojas verdaderas	7 días
Cultivo de ápices y nudos	
Inducción de brotación múltiple en medio MS con reguladores de crecimiento	34 días
Diferenciación y crecimiento de los brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento	30 días
ENRAIZAMIENTO	
Aparición de las raíces principales	5 días
Formación de plántulas completas de 5-7 cm de altura con hojas y 10 a 15 raíces principales con raíces secundarias	25 días
ACLIMATIZACIÓN	
Cuatro lotes de 20 plantas	40 días
Sobrevivencia	100%

Como se observa en la Tabla 18, el tiempo que abarcó el desarrollo de las plantas de *Ipomoea carnea*, desde su germinación hasta su aclimatización fue de 5 meses (147 días). Lograr la formación de plantas completas en un tiempo relativamente corto nos indica que el protocolo de propagación desarrollado en este trabajo permitiría producir plantas en cantidad suficiente y en poco tiempo para el establecimiento de cultivos controlados en campo para efectos de conservación, estudio y aprovechamiento del recurso.

Figura 21. Secuencia de la micropropagación de *Ipomoea carnea*

5.6 Cultivo de callo

Los órganos de las plantas, cuando experimentan algún tipo de ataque, responden de manera natural con la formación de un tejido amorfo conocido como callo. En el caso de cultivo de tejidos, la formación de callo se induce en los explantes con la adición de auxinas en un medio nutritivo y bajo condiciones controladas.

Gómez (1998) define como callo al crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación de callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, que posteriormente se desdiferencian ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua y acelerada, y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

Durante la fase de inducción de *I. carnea* los explantes nudos o cotiledones que se encontraban en presencia de BAP combinado con AIA generaron callo en la zona de corte. Mientras que los explantes que se colocaron en medio sin reguladores de crecimiento o en medio con 0.5 ó 1.0 mg/l de AIA no presentaron la formación de callo.

Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento que contenía 2mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA.

Aunque en todos los tratamientos que tenían BAP se generó callo, sólo se eligió aquellos callos que parecían estar menos compactos y no presentaban oxidación para colocarlos en medio MS líquido con las concentraciones hormonales antes mencionadas a fin de inducir su crecimiento y disgregación. Después de 30 días en medio líquido en agitación, el callo no presentó cambios significativos en volumen ni consistencia. A fin de inducir el crecimiento del callo, este se subcultivó a medio MS sólido adicionado con 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de AIA, treinta días después, el callo de *I. carnea* se utilizó para hacer extracciones con solventes orgánicos y realizar pruebas de toxicidad contra *S. frugiperda*.

5.7 Bioensayos

Para evaluar el potencial insecticida de los callos de *Ipomoea carnea* se emplearon los extractos obtenidos con hexano en una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y los extractos de cloroformo y metanol en una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ basándonos en las investigaciones realizadas por García (2002) y Toledo (2001).

Al realizar el análisis estadístico con los datos obtenidos de las pruebas con extractos metanólicos y clorofórmicos se encontró que no hay diferencia significativa entre los tratamientos pero si hay una diferencia significativa $p < 0.001$ entre los tratamientos experimentales y los tratamientos control.

Tabla 18 Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda*

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Total larvas	Larvas muertas	Mortalidad %
Cc	0	24	1	4,1
Cm	0	24	3	12,5
Ch	0	24	3	12.5
Ec	200	24	21	87,5
Ec	200	24	21	
Em	200	24	22	89.6
Em	200	24	21	
Eh	400	20	5	25

Cc= control cloroformo

Ec= experimental cloroformo

Cm= control metanol

Em= experimental metanol

Ch= control hexáno

Eh= experimental hexáno

Los mejores resultados de mortalidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* se registraron al emplear extractos metanólicos y clorofórmicos de callos, alcanzando un 91.7%, y 87.5% de mortalidad respectivamente (**Tabla 18**).

El extracto hexánico se aplicó a $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ porque al disolver el concentrado el hexano se evaporó. Aun cuando la dosis empleada estaba al doble de concentración respecto a los extractos metanólicos y cloroformicos, el porcentaje de mortalidad fue apenas del 25 %.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Toledo (2001) quien reporta que al emplear extractos clorofórmicos de flores en botón y extractos metanólicos de hojas de *I. carnea* a una concentración de $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se alcanzó más del 90% de mortalidad en las larvas de *Spodoptera frugiperda*. Por otra parte, García (2002) evaluó la actividad insecticida de *I. muruoides* en *Spodoptera frugiperda* observando que el extracto clorofórmico de callos obtuvo un 100 % de mortalidad en la concentración de $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Vera (2005) encontró que los mejores resultados de mortalidad en larvas de *S. frugiperda* se registraron al emplear extractos metanólicos (200 µg/cm²) de callos desdiferenciados de 90 días de cultivo, empleando los reguladores 2,4-D y AIA a 13.57 µM, alcanzando un 95% y 91%, respectivamente.

Los resultados obtenidos son alentadores para seguir en la búsqueda de nuevas alternativas de control biológico

6. CONCLUSIONES

- ✓ En la germinación de las semillas de *Ipomoea carnea* se establecieron como condiciones:
 - a) La escarificación de las semillas para estimular y acelerar el proceso de germinación al romper la dormancia física causada por la dureza de la testa.
 - b) El fotoperiodo de 16 h luz /8 h oscuridad y una temperatura de 25 ± 2 . °C
 - c) Medio MS al 50 % de sales.
- ✓ El medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP y AIA resultó ser efectivo para la inducción de brotes o callo en los explantes.
- ✓ Los cotiledones no fueron un explante apropiado para la inducción de brotación, pero pueden resultar convenientes cuando se desea inducir la formación de callo o raíces adventicias.
- ✓ Los nudos cotiledonares y los ápices de brote generaron brotes adventicios.
- ✓ El empleo de citocininas en el medio propició la formación de callo en la base del explante.
- ✓ El callo en la base de los explantes causo el debilitamiento e incluso la muerte de algunos brotes.
- ✓ La recuperación de los brotes y la formación de nuevos brotes se logró al eliminar el callo de la base de los explantes y colocarlos en medio MS fresco sin reguladores de crecimiento.
- ✓ Para hacer eficiente la brotación múltiple de *I. carnea* es necesario cultivar los explantes en un medio con hormonas por un tiempo corto, posteriormente retirar el callo que se haya formado en la base del explante para evitar que los brotes generados sean afectados y finalmente individualizar y colocar los brotes en medio MS sin reguladores de crecimiento para que terminen de diferenciarse y elongarse.
- ✓ La respuesta morfogénética en *I. carnea*, a partir del cultivo de nudos cotiledonares y ápices de brote en medio MS modificado, fue diferencial respecto al número de brotes formados, siendo el primero el que tuvo mayor respuesta

- ✓ La mejor respuesta en cuanto a número de brotes y organización del tejido para nudos cotiledonares se presentó en los explantes que habían estado en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de BAP y en ausencia de AIA. En el caso de los ápices de brote la combinación de 4 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIA fue la que dio la mejor respuesta.
- ✓ Para el enraizamiento de *I. carnea* no es necesario el empleo de reguladores de crecimiento
- ✓ La aclimatización de las plantas generadas resultó exitosa, el porcentaje de sobrevivencia fue del 100%.
- ✓ Los extractos metanólicos y clorofórmicos del callo de *I. carnea* mostraron actividad insecticida contra las larvas de *Spodoptera frugiperda* causando un 91% y 87.5% de mortalidad respectivamente.
- ✓ Los extractos hexánicos mostraron una débil actividad insecticida causando apenas el 25 % de mortalidad en las alrvas.

7. APÉNDICE

7.1 Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) 1962.

N°	COMPONENTES	g/l
1	MACRONUTRIENTES	
	(NH ₄)NO ₃	1.65
	KNO ₃	1.9
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37
	KH ₂ PO ₄	0.17
2	CALCIO	
	CaCl ₂	0.44
3	MICRONUTRIENTES	
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.0086
	H ₃ BO ₃	0.0062
	KI	0.00083
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.00025
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.000025
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.000025
4	FIERRO	
	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.0278
	Na ₂ EDTA	0.0373
5	VITAMINAS	
	Tiamina * HCl	0.0001
	Ácido Nicotínico	0.0005
	Piridoxina * HCl	0.0005
6	INOSITOL	0.10
7	GLICINA	0.002
8	CARBOHIDRATOS	
	Sacarosa	30.0

7.2. Dieta para *Spodoptera frugiperda*

Ingredientes para preparar un litro de dieta:

Ingredientes	Cantidad
Harina de soya	71.1 g
Germen de trigo	31.7 g
Sales Wesson	10.6 g
Sacarosa	13 g
Metil-paraben	1.6 g
Ácido sórbico	1.0 g
Ácido ascórbico	4.3 g
Agar	14 g
Sol. Vitamínica	3.5 ml
Sol. Ácido acético (25%)	12 ml
Sol. Formalina (10%)	4.4 ml
Sol. Cloruro de colina (15%)	7.3 ml
Agua destilada	1000 ml

Ingredientes para prepara solución vitamínica, aforar a 35 ml con agua destilada:

Ingredientes	Cantidad (g)
Pantotenato de calcio	0.42
Niacinamida	2.31
Riboflavina	0.105
Ácido fólico	0.0525
Tiamina	0.0525
Biotina	0.0042
Vitamina B12 (Axofo Plus)	0.875 ml

Licuar los ingredientes secos (excepto el agar, el cual se disuelve en 500 ml de agua destilada caliente, dejar hervir por espacio de 5 minutos a temperatura baja) en 500 ml de agua destilada, posteriormente agregar las vitaminas y las demás soluciones, al final vaciar el agar caliente, una vez bien incorporados todos los ingredientes se puede vaciar en moldes.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdelhadi, A. A., Kheir, Y. M. and Hassan T. 1989. A succinylcholine-like action of an *Ipomoea carnea* Jacq. subsp. *fistulosa* (Mart. ex Choisy) extract. Pharmacological Research. 21 (4): 431-437.

Agramonte, D. P., Jiménez, F. T. and Dita, M. A. R. 1998. Aclimatización. pp. 193-205. En: Pérez J. N. (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.

Aguilar, A. 1999. La medicina tradicional popular actual. Herbolaria Mexicana: guías prácticas. México Desconocido 5: 49

Alvarado, C. Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, P. J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Cuba. Pp. 81-104.

Álvarez-Buylla, R. E. 2004. Aspectos ecológicos, biológicos y de agrobiodiversidad de los impactos del maíz transgénico. En: Muñoz R. J. Alimentos Transgénicos. Ciencia, ambiente y mercado: un debate abierto. Pp. 181-218.

Amin, M. N., Rahman, M. M. and Manik, M. S. 2003. *In vitro* clonal propagation of *Paederia foetida* L. – a medicinal plant of Bangladesh. Plant Tissue Culture 13 (2): 117-123.

Andrijany, V. S., Indrayanto, G. and Soehono, L. D. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt on saponin steroids content in callus cultures in bioreactors.

Anju, G. and Pawan, K. J. 1992. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mug bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Plant Cell Tissue and Organ Culture 29 (3): 199-205.

Anónimo. 2005. Encuesta Nacional sobre la Rentabilidad del Maíz. Consejo Nacional de Productores de Maíz A.C.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 691 p.

Arqueta, A., Cano, L. y Rodarte, M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. No. 1 Instituto Nacional Indigenista. México. Pp. 351-352.

Asano, N., Yokoyama, K., Sakurai, M., Ikeda, K., Kizu, H., Kato, A., Arisawa, M., Hoke, D., Dragar, B., Watson, A. and Nash, R. 2001. Dihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry* 57: 721-726.

Bachhav, K. V., Burande, M. D., Rangari, V. D. and Mehta, J. K. 1999. Effect of aqueous extract of *Ipomoea carnea* leaf on isolated frog and mouse heart. *Indian Journal of Experimental Biology*. 37 (11): 1080-1084.

Barbosa, R. C., Riet-Correa, F., Medeiros, R. M .T., Lima, E. F., Barros, S. S., Gimeno, E.J., Molyneux, R. J. and Gardner, D. R. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicon* 47: 371–379.

Beena, M. R. and Martin, K. P. 2003. *In vitro* propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through somatic embryogenesis. *In vitro Cell Development Biology—Plant* 39:510–513.

Begum, F., Amin, M. N. and Azad, M. A. K. 2002. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. *Plant Tissue Culture* 12 (1): 27-35.

Benjamin, B. D., Roja, P. C., Heble, M. R. and Chadha, M. S. 1987. Multiple shoot cultures of *Atropa belladonna*: effect of physicochemical factors on growth and alkaloid formation. *Journal Plant Nutricion*. 129: 129-135.

Bewley, J. D. and Black., M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.

Bieber, W. L., Silva, A. A., Correa Lima, R. M., Chiappeta, A., Do Nascimento, S. C., De Souza, I. A., De Mello J. F. and Veith, A. J. 1986. Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* 25 (5): 1077-1081

Block, S. S. 1977. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Lea & Febiger. Philadelphia.

Britto, Mary, P., Muthukumar, B., Natarajan E. and Arockiasamy, D. I. 2002. Micropropagation of *Solanum incanum* L. from node and leaf explants. Journal of Phytological Research 15 (1): 17-20.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant metabolites: a historical perspective. Plant Science 161: 839-851.

Canter, H.P., Thomas, H., Ernst, E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. Trends in Biotechnology 23 (4): 180-185.

Garcia R. M. 1992. Aplicaciones de polvos y extractos vegetales para el combate del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctunidae) en la región central costera del Estado de Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Nacional Autónoma Chapingo. Pp 1-11.

Chand, S. and Singh, A. K. 2004. *In vitro* shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose tree, *Pterocarpus marsupium* Roxb. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 40: 464-466.

Chu, D. M., Miles, H., Toney, D., Ngyuen, C. and Cabral, M. F. 1998. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. Parasitological Research 84 (9): 746-752.

Davies-Coleman, M. T. and Rivett, D. E. 1989. Natural occurring 6-substituted 5,6-dihydro- α -pirones. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. (W. Herz, H. Grisebach, Kirby, G. W., Tamm, C. eds.) Springer_Verlag, New York. Fortschr. Chem. organ Naturstoffe. Pp. 1-35.

Debergh, P. 1991. Acclimatization. Techniques of plants from *in vitro*. Acta Horticulturae 289: 291-299.

Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. 1991. Micropropagation. Technology and application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. Pp. 1-13.

Denng, R. and Donnelly, D. J. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. Can. J. Plant. Science 73: 1105-1113.

De Souza, M. M., Madeira, A., Perti, C., Krogh, R., Yunes, A. and Cechinel-Filho, V.. 2000. Anticonceptive properties of methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. Journal of Ethnopharmacology 69: 85-90.

Dev, S. and Koul, O. 1997. Insecticides of natural origin. Harwood Academic Publishers. Australia. Pp 365.

FAO 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición No. 25.

FAO 2004. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Roma. 227 P.

Ferreira, A. A., Amaral, F. A., Duarte, I. D. G., Oliveira, P. M., Alves, R. B., Silveira, D., Azevedo, A. O., Raslan, D. S. and Castro, M. S .A. 2006. Anticonceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. Journal of Ethnopharmacology 105: 148–153

Finch, W. E. 1958. Disinfectants. Their values and uses. Chapman & Hall Ltd. Great Britain.

Flores, S., Morales, R. J. y García A. A. 1997. Convolvulaceae. Etnobotánica. Etnoflora Yucateense. Fascículo 12: 144-157.

Franca, C. S., Duarte, I. B., Moraes, R. M. and Pereira, A. M. S. 1995. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphytum* (Barbatimão). Plant Cell Tissue and Organ Culture 42: 291-293.

Furmanowa, M., Jozefowicz, J. and Oledzka, H. 1986. Rozmnazanie *in vitro* *Catharanthus roseus* Przez paczki szczy towe i. boczne. XIII. Naukowy Zjazd Poiskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, katowice Publ., Streszczenia. 155 p.

García, J. C. 2002. Establecimiento de las condiciones experimentales para la inducción de cultivos *in vitro* de callos, raíces adventicias y cultivos transgénicos de *Ipomoea murucoides* Roem & Schullt (Convolvulaceae), como base para su estudio fotoquímico y actividad biológica. Tesis de Licenciatura. Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegenetic, Limited, Great Britain. 690 Pp.

Gómez, R. K. 1998. Embriogénesis somática. pp. 57-77. En: Pérez, J. N. (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba.

Gottlieb, O. 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29 (6): 1715-1724.

Haraguchi, M., Gorniak, L. S., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A., Nash, J. R., Molyneux, J. R. and Asano, N. 2003. Alkaloidal Components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agriculture Food and Chemistry* 51: 4995-5000.

Hartmann, T. H. y Kester, D. E. 1962. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Continental. México. D.F. Pp 137-145, 165-168.

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85 (12): 1704-1712.

Hernández, A. J. M. 1996. Micropropagación de *Piqueria trinervia* y su sobrevivencia en suelo derivado de cenizas volcánicas del Ajusco. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 97 p.

Hernández, A. J. M. 1998. Obtención de cromeros (encecalina y desmetilencecalina) en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Helliantella quinquenervis* (Hook) A. Gray. Tesis de Maestría. UNAM. México. D.F.

Hernández-Carlos, B., Bye, R. and Pereda-Miranda, R. 1999. Orizabins V-VIII, tetrasaccharide glycolipids from the mexican scammony (*Ipomoea orizabensis*). *Journal Natural Products* 62: 1096-1100.

Howar, H. 1981. Botanical remedies of South and Central America, and the Caribbean: An archival analysis. Part V. *Journal of Ethnopharmacology* 4:129-158.

Hu, C. V. and Wang, J. P. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: *Hand Book of Plant Cell Culture*. Evans, D. A.; Ammirato, P. V.; Sharp W. R., and Yamada, Y. (eds). MacMillan Publishing, New York. V.1, Pp 177-227.

- Hurtado, M. y Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, D. F. 230 Pp.
- Hydman, S. E., Hasegawa, P.M. and Bressan R. A., 1982. Stimulation of root initiation from culture rose shoots through the use of reduce concentration of mineral salts. Hort Science 17: 82-83.
- Jiménez, G. E. 1998. Generalidades de Cultivo *in vitro*. Pp. 13-24. En: Pérez J. N. (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.
- Joshi, M. and Dhar, U. 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew - an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. Plant Cell Reports 21: 933-939.
- Juliani, H. (Jr), Koroch, A., Juliani, H. and Trippi, V. 1999. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. Plan Cell Tissue and Culture 59 (3): 175-179.
- Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapková, V. and Schäfer, C. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. Plant Science 161: 695-701.
- Kane, E. M., Bird, K. T. and Lee, T. M. 1993. *In vitro* propagation of *Ipomoea pes –caprae* (Railroad-Vine). Journal of Coastal Research 9 (2): 356-362.
- Knevel, I. C., Venema, H. G. and Lubke, R. A. 2002 The search for indigenous dune stabilizers: Germination requirements of selected South African species. Journal of Coastal Conservation 8: 169-178.
- Królicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Malinski, E., Szafranek, J. and Lojkowska, E. 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Science 2 (5): 259-264
- Kueh, J. S. H., MacKenzie, I. A. and Pattenden, G. 1985. Production of chrysanthemic acid and pyrethrins by tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariae-folium*. Plant Cell Repositrs 4: 118-119.
- Lagunes, T. A. 1994. Extractos y polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del fríjol en la agricultura de subsistencia. Pp 32.
- Leyser, O. 1997. Auxin: Lessons from a mutant weed. Physiologia Plantarum 100: 407-414

Linajes, A., Rico-Gray V. and Carrion, G. 1994. Traditional production system of the root of jalap, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in central Veracruz, México. *Economic Botanic* 48: 84-89.

Litz, R. E. and Jaiswal, V. S. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: *Micropropagation. Technology and Application*. Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman. (eds). Kluwer Academic Publishers. London. Pp. 247-263.

Litz, R. E. and Jarret, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. pp.143-172. En: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Colombia.

Liu, Q., Kokubu, T. and Sato, M. 1990. Plant regeneration in stem, petiole and leaf explant cultures of *Ipomoea triloba* L. *Japanese Journal of Breeding* 40: 321-327.

Macdonald, H. 1997. Auxin perception and signal traduction. *Physiologia Plantarum* 100: 423-230.

Matuda. 1964. El género *Ipomea* en México. An. Instituto de Biología, UNAM. México. Pp: 63-64.

Martin, K. P. 2002. Rapid propagatiojn of *Holostemma ada-kodein* Schult., a rare medicinal pant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. *Plant Cell Reports* 21: 112-117

Mayer, A. and Poljakoff-mayber, A. 1982. *The germination of seeds*. (3^a Ed) Pergamon press. 211 P.

Mc Donald, J. A. 1992. Evolutionary implications of typical and aomalus secondary growth in arborescent *Ipomea* (Convolvulaceae). *Bulletin Torrey Botanical*. C1. 119: 262 – 267.

Mc Donald, J. A. 1997. Convolvulaceae. *Taxonomía y Florística*. Etnoflora Yucateense. Fascículo 12: 7-143.

Mc Leod, J. K. and Ward, A. 1997. Structural investigation of resin glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *Journal of Natural Products* 60: 467-471.

Molyneux, R. J., Mc Kenzie, R. A., O'Sullivan, B. M. and Elbein, D. A. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors Swainsonine and Calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea* sp.) Q6 [AFF. calobra] and correlation with toxicity. *Journal of Natural Products* 58 (6): 878-886.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiology Plant* 15:473-497

Murguía, G. S. 1995. Morfología y anatomía reproductiva de nuevas especies de la serie arborescentes (*Ipomoea*, Convolvulaceae L.). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 90 P.

Muthukumar, D., Arockiasamy, I. and Natarajan, E. 2004. Direct organogenesis in *Datura metel* L. from *in vitro* and *in vivo* nodal explants. *Indian Journal of Biotechnology* 3 (3): 449-451.

Navarro-Ruiz, A., De la Mora, G. P., Villanueva-Michel, M.T. y Domínguez-Rodríguez, J. R. 1996. Anticonvulsant effect of aqueous, hydroalcohol and chloroform extracts from *Ipomoea stans* root in the rat. *Phytotherapy Research* 10: 242-244.

Noda, N., Takahashi, N., Miyahara K. and Yang, C. 1998. Stoloniferins VIII-XII, resin glycosides, from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* 48 (5): 837-841.

Orellana, P. P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Pérez, P. J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Cuba. Pp. 151-176.

Ortiz, G. S. y Otero, A. A. 2006. México como el centro de origen del maíz y elementos sobre la distribución de parientes silvestres y variedades o razas de maíz en el norte de México. Coordinación de programa de bioseguridad. Instituto Nacional de Ecología.

Osorio A., F. J. 1949. Ciclo biológico y control del gusano cogollero del maíz. Tesis profesional. Depto. De Parasitología Agrícola. E. N. A. Chapingo, México. 52 p.

Osuna, 1994. Efecto del extracto metabólico de *Ipomoea intrapilosa* (Rose) sobre la respuesta serotoninérgica en útero de rata. Tesis de maestría en ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UAEM Xochitepec, Morelos. Pp 72.

Osuna, L., Pérez-Monter, G. Campos, H., M., Rojas, J. A. and Meckes, M. 1996. Effect of *Ipomoea intrapilosa* metanol extract on the serotonergic response in rat uterus. *Phytotherapy Research* 10: 257-259.

Páska, C., Innocenti, G., Kunvári, M., László, M., Szilágyi, L. 1999. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry* 52: 979-883.

Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wikramaratne, D. B. M., Pezzuto, J. M. and A. D. Kinghorn. 1993. Tricolorin A, major phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* 56 (4): 571-582.

Pérez, Molphe-Balch, E. M., Ramírez, M. R., Núñez, P. H. G. y Ochoa, A. N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179 P.

Pérez, P. J. N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Cuba. 390 P.

Perusquia, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E. and Mata, R. 1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 63-69.

Pierick, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-prensa. Madrid, España. 326 P.

Pongprayoon, V., Baecktröm, P., Jacobson, V., Lindström, M. and Bohlin, L. 1991. Antiespasmotic activity of β -Damascenone and E-Phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica* 58: 19-21.

Pongprayoon, V. P., Baecktröm, Jacobson, V., Lindström, M. and Bohlin, L. 1992. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica* 57 (6): 515-518.

Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecěk, P., Haisel, D. and Plzakova, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.

Primo, E. 1991. Ecología Química. Nuevos aspectos de la lucha contra insectos. Mundi-prensa. España.

Rajasekaran, T., Rajendran, L., Ravishankar, G. A. and Venkataraman L. V. 1991 Influence of nutrient stress on pyrethrin by culture cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Current Science 60 (12): 705-707.

Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101–153.

Raven, H. P., Ray, F. E. and Eichhorn, S. E. 1999. Biology of plants. W.H. Freeman and Company Worth Publishers. USA. pp. 672-701.

Razdan, M. K. 2002. Introduction to Plant Tissue Culture. Second edition. Science Publishers, Inc. USA. 375 pp.

Reynolds, W., Yu, M., Enríquez, R. G., González, H., León, I., Magos, G. and Villarreal M. L. 1995. Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from *Ipomoea stans*. Journal of Natural Products 58 (11):1730-1734.

Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 953 p.

Rojas, G. M. Y Ramírez, H. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. Fisiología-Tecnología-Experimentación. 2ª Ed. Limusa México, D. F. 263 P.

Rodríguez, H. C. 2001. Plantas contra Plagas. Potencial Práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. Y la Universidad Autónoma Metropolitana –Xochimilco. Pp. 123.

Rout, G. R., Samantaray S. and Das, P. 2000. *In vitro* manipulation of medicinal plants. Biotechnology Advances 18: 91-120.

Saad, I., Díaz, E., Reyes-Chilpa, R., Rublo, A., Jiménez-Estrada, M. 2000 Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia*. Phytochemistry 55: 51-57.

Saad, I., Briseño, A., Solleiro, J. L. y Castañón R. 2003 Impacto de la biotecnología sobre el manejo integrado de plagas en México. AgroBio México, A. C.

Sasa, S. F., Austin, D. and Olmstead G. R. 2003. Classification of Convolvulaceae: A Phylogenetic Approach. Systematic Botany 28(4): 791–806.

Schimming, T., Siems, K. J., Mann, P., Reblin, B. T., Milson, J., Jhonson, R. W., Deroin, T., Austin, D. F. and Eich, E. 2005. Calistegynes as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. Phytochemistry 66: 469-480.

Spoerke, D. G. and S. C. Smolinske. 1990. Toxicity of houseplants. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA. 335 P.

Sykes, G. 1958. Disinfection and Sterilization. E. & F. N. Spon Ltd. Great Britain.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. Plant Physiology. Second edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland Massachusetts. 690 p.

Taméz, G. P., Wong, L. G., Roldan, H. M., Gutiérrez, C. G., Padilla, C. R., Flores, R. G. y Guerra, R. T. 2001. Bioinsecticidas: su Empleo, Producción y Comercialización en México. Ciencia UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León. México Vol IV. No. 002. Pp 143-152.

Terzi, M. and Loschiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. pp. 54-66. In: Bhojwani, S. S. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers. The Netherlands.

Thorpe, T. A. 1990. The Current Status of Plant Tissue Culture. pp. 1-33. In: Bhojwani, S. S. (ed.) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers. USA.

Thomas, G. T., Rao S. and Lal, S. 2003. Mosquito Larvicida Properties of Essential Oil of an Indigenous Plant, *Ipomoea cairica* Linn. Japanese Journal of Infect Deseas. 57: 176-177.

Toledo E. (2001). Propiedades insecticidas de algunas especies de *Ipomoea* (CONVOLVULACEAE) del Estado de Morelos. Tesis profesional. Facultad de Biología. Iztacala Estado de México. Pp1-15.

Thorpe, T. A. and Stasolla, C. 2001. Somatic Embryogenesis. pp. 279-336. In: Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. (eds.) Current Trends in the Embriology of Angiosperms. Kluwer Academic Publishers. London.

Valdéz, 1999. La herbolaria en el noroeste de México. Herbolaria mexicana: guías prácticas. México Desconocido. (4): 14-53.

Vanegas, E. P., Cruz, H. A., Valverde, Ma. E. y Paredes-López O. 2002 Plant regeneration via organogenesis in marigold. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69: 279-283.

Vázquez-FLota, F., Moreno, V. O., Marinda-Ham, M., Coello, C. J. and Loyola V. V. M. 1994. Catharanthine and Ajmalicine in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38: 273-279

Vera, C. L. 2005. Estudio del efecto de algunos reguladores del crecimiento vegetal en la inducción a callos de *Ipomoea murucoides* Roem. et Schult (convolvulaceae): actividad insecticida y la relación con sus características estructurales. Tesis de maestría. UAEM. Cuernavaca, Morelos.

Watson, A. A., Fleet, J. W. G., Asano, N., Molyneux, J. R. and Nash, J. R. 2001. Polyhydroxylated alkaloids-natural occurrence and therapeutic applications. Phytochemistry 56: 265-295.

Weinzierl, R. 2000. Botanical Insecticides, soaps, and Oils. In: Biological and Biotechnological control of insects pets. Rechcigl J. and Rechcigl N. (Eds.). Lewis Publishers. Washintong, D. C., U.S.A. Pp. 101-121.

Woong – Young, S. and Bhojwani, S. S. 1999. Morphogenesis in Plant Tissue Cultures. Kluwer Academia Publishers. London. 520 P.

Yukumine, Y. H., Yabata, H., Hara, Y. and Yamada, H. 1994. Increase of scopolamina production by high density culture *Duboisia myoporoides* roots. Biosciense. Biotechnology Biochemistry 58: 1447-1450

Zárate, R., Cantos, M. y Troncoso, A. 1997. Induction and development of adventitious shorts of *Atropa baetica* as a means of propagation. Euphytica 94: 361-366.